

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIANA MÜLLER BARK

**TRATAMENTO COMBINADO DE TEMOZOLOMIDA E SINVASTATINA TEM AÇÃO
CITOTÓXICA E ALTERA A FORMAÇÃO DE NEUROESFERAS EM LINHAGEM DE
GLIOBLASTOMA HUMANO**

CURITIBA

2017

JULIANA MÜLLER BARK

**TRATAMENTO COMBINADO DE TEMOZOLOMIDA E SINVASTATINA TEM AÇÃO
CITOTÓXICA E ALTERA A FORMAÇÃO DE NEUROESFERAS EM LINHAGEM DE
GLIOBLASTOMA HUMANO**

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, no
Curso de Pós-Graduação em Ciências -
Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sheila M. B. Winnischofer

Coorientadora: Dr^a. Marina Trombetta Lima

CURITIBA

2017

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Bark, Juliana Müller

Tratamento combinado de temozolomida e sinvastatina tem ação citotóxica e altera a formação de neuroesferas em linhagem de glioblastoma humano. / Julina Müller Bark. – Curitiba, 2017.
83 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Sheila M. B. Winnischofer

Coorientador: Marina Trombetta Lima

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

1. Glioma 2. Células-Tronco 3. Sinvastatina 4. I. Título II. Winnischofer, Sheila Maria Brochado III. Lima, Marina Trombetta Lima IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

CDD (20. ed.) 614.5999

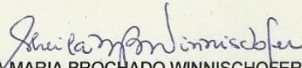


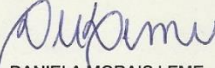
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA)

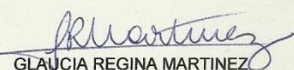
TERMO DE APROVAÇÃO

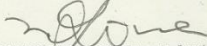
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de JULIANA MÜLLER BARK intitulada: **Tratamento combinado de temozolomida e sinvastatina tem ação citotóxica e altera a formação de neuroesferas em linhagem de glioblastoma humano**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação.

CURITIBA, 28 de Março de 2017.


SHEILA MARIA BROCHADO WINNISCHOFER
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


DANIELA MORAIS LEME
Avaliador Externo (UFPR)


GLÁUCIA REGINA MARTINEZ
Avaliador Interno (UFPR)


MARINA TROMBETTA LIMA
Co-orientador - Avaliador Externo (USP)

Aos meus pais, Riad e Marlene,
por todo o apoio e amor incondicional.

À minha irmã, Carolina, por todo
incentivo, carinho e parceria.

AGRADECIMENTOS

À minha família, por estarem sempre por perto, sendo meu porto seguro. Por me incentivarem a sempre fazer o meu melhor. E por terem me proporcionado e guiado meu caminho para chegar até aqui. Por todo o apoio e o amor de sempre.

Aos meus amigos, por me distraírem na presença e me entenderem na ausência. Por me confortarem e sempre me apoiarem.

À melhor orientadora que eu poderia pedir, Prof^a Sheila. Meu muito obrigada por tudo! Por estar sempre disposta a ensinar. Por toda a empolgação que você me faz sentir a cada vez que saio da sua sala. O seu encantamento pela ciência é contagiante. Obrigada pela confiança e por todo o carinho. Você é um exemplo incrível de pesquisadora, mãe e pessoa para mim.

À minha querida coorientadora, Dr^a Marina. Que mesmo distante fisicamente, esteve presente para me explicar e ensinar. Sempre com simpatia e um sorriso lindo no rosto! Por sempre me salvar e ajudar com os protocolos e análises. Muito obrigada por toda a dedicação e carinho a esse projeto.

A todos os colegas e amigos do grupo de Oxidações. Em especial, à Paloma, Will e aos Sheilets: Otávio, Rafa e Carol. Muito obrigada por todas as ajudas nos experimentos, e também por deixarem minhas manhãs, tardes e muitas vezes noites mais descontraídas e divertidas. Às ICs Lis, Melissa e Susan, por toda a ajuda nos experimentos e troca de experiências. Aos amigos de outros corredores, Fran, Ester, Sarah, Rafael, pela troca de ideias, incentivos e apoio.

Aos colaboradores: Prof^a Mari Cleide Sogayar, do Núcleo de Terapia Celular e Molecular (NUCEL/NETCEM) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM-USP); Prof^o Alexander Henning Ulrich do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP) e Dra^a Erika Molina, por viabilizarem esse projeto ao contribuírem com reagentes indispensáveis.

Ao Prof^o Edvaldo da Silva Trindade do Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e seus alunos por todo o auxílio e disposição na parte experimental e análises de Microscopia Confocal.

À Thayná e Caroline, do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná (UFPR), pelo auxílio no plaqueamento das minhas primeiras gotinhas.

Às agências financiadoras.

A alegria não chega apenas no encontro do
achado, mas faz parte do processo da busca.

(PAULO FREIRE)

RESUMO

Gliomas são os tumores mais comuns derivados do Sistema Nervoso Central. Dentre seus tipos, o glioblastoma (GBM) é o mais agressivo e que apresenta pior prognóstico, com tempo de sobrevivência dos pacientes que varia de 12 a 15 meses. O tratamento para GBM consiste na retirada cirúrgica da massa tumoral, seguida de radioterapia e quimioterapia, sendo a temozolomida (TMZ) a droga padrão utilizada. No entanto, apesar das estratégias terapêuticas atuais, esse tipo de tumor frequentemente se mostra resistente, apresentando altas taxas de recorrência. Um dos motivos dessa recidiva justifica-se pela presença das CSCs (Cancer Stem Cells). Essas células possuem propriedades características de células tronco, como a capacidade de crescer *in vitro* como agregados celulares, através do cultivo em substratos não aderentes, meios de cultura definidos, crescimento em constante movimento e ainda por meio das *hanging drops*. A técnica de *hanging drop* baseia-se no cultivo das células que ficam suspensas em uma tampa de placa de cultura devido à tensão superficial, então a gravidade induz a agregação de células. Hipóteses atuais sugerem que as CSCs seriam as responsáveis pela recidiva da massa tumoral, mesmo após o tratamento, já que esse é direcionado às células tumorais já diferenciadas. Nesse sentido, a procura por terapias combinadas que atinjam tanto as células diferenciadas quanto as CSCs torna-se uma alternativa interessante aos tratamentos atuais. Dados na literatura mostram uma correlação entre o uso das estatinas e uma menor incidência de gliomas. Os efeitos anti-tumorais da sinvastatina (SVA) tem sido investigados, no entanto ainda não se sabe qual sua ação em células tronco tumorais. Sendo assim, os objetivos desse trabalho foram: padronizar condições de cultivo de CSCs e investigar quais os efeitos do tratamento conjunto de TMZ e SVA nessa subpopulação de GBM. Primeiramente, foi demonstrado que o cultivo das células U87MG por 3 dias em *hanging drop* e 5 dias em substrato não aderente foi capaz de enriquecer a neuroesfera em CSCs, através da presença do marcador CD133 em microscopia confocal e aumento da expressão de CD133, CD15 e Sox-2, por q-PCR. Essas esferas enriquecidas, quando tratadas com a combinação de fármacos, não sofreram diminuição de tamanho, porém tiveram sua morfologia alterada após tratamento com SVA e TMZ+SVA. Ainda, o uso da SVA e a combinação de TMZ e SVA foi capaz de impedir a formação das esferas quando adicionados durante o período de 72h em *hanging drop*. Em paralelo, foi realizado o cultivo de CSCs de GBM com o meio definido NSC e foram também avaliados os efeitos da combinação dos fármacos nas esferas formadas. Foi visto um padrão de diminuição no número e no tamanho das esferas formadas, aumento da dupla marcação de anexina e PI e diminuição da expressão de CD133, CD15 e Sox-2 após tratamento conjunto TMZ e SVA. Nossos resultados mostram a efetiva padronização da metodologia de *hanging drop* e substrato não aderente para o cultivo das CSCs de GBM e também a potencialização do efeito citotóxico da TMZ quando em conjunto com a SVA nas neuroesferas de GBM.

Palavras-chave: Glioblastoma. Células tronco tumorais. Neuroesferas.

ABSTRACT

Gliomas are the most common tumors derived from the Central Nervous System. Among its types, glioblastoma (GBM) is the most aggressive, with median survival ranging from 12 to 15 months. Treatment for GBM consists of maximal surgical resection followed by radiotherapy and chemotherapy, with temozolomide (TMZ). However, despite current therapeutic strategies, this type of tumor is often resistant, presenting high rates of recurrence. One of the reasons for this recurrence is justified by the presence of CSCs (Cancer Stem Cells). These cells present properties of stem cells, such as the ability to grow *in vitro* as cell aggregates, through non-adherent substrates culture, defined culture media, growth in constant movement and through *hanging drops*. The *hanging drop* technique is based on culturing cells suspended in a plate cap due to surface tension, and then gravity induces cell aggregation. Current hypotheses suggest that CSCs are responsible for restructuring tumor mass, even after treatment, since current therapies are directed to already differentiated tumor cells. In this sense, the search for combined therapies that aim differentiated and non-differentiated tumor cells become an interesting alternative to current treatments. Some studies show a correlation between the use of statins and a lower incidence of gliomas. The antitumor effects of simvastatin (SVA) have been investigated, however it is not yet known what are their action on tumor stem cells. Therefore, this work's objectives were to standardize conditions for CSC culture and investigate the effects of the combined treatment of TMZ and SVA in CSCs of GBM. First, U87MG cells were cultured for 3 days in *hanging drop* and 5 days on non-adherent substrate, this protocol was shown to enrich the neurosphere in CSCs by the presence of CD133 marker in confocal microscopy and increased expression of CD133, CD15 and Sox-2, by q-PCR. These enriched spheres were treated with the combination of drugs, but did not showed decrease in their size. However, their morphology was altered when treated with SVA and TMZ + SVA. Also, the SVA and the combination of TMZ and SVA was able to inhibit the formation of spheres when plated in *hanging drop*. In parallel, culture of GBM CSCs with the defined medium NSC was performed and the effects of the combination of both drugs on the spheres formed were evaluated. A decreasing pattern in the number and size of spheres formed was observed, with an increase in the levels of annexin and PI, and a decrease on CD133, CD15 and Sox-2 mRNA expression after TMZ and SVA treatment. Our results show the effective standardization of the *hanging drop* and non-adherent substrate technique for GBM CSCs culture and also the potentiation of the cytotoxic effect of TMZ when combined with SVA in GBM neurospheres.

Key-words: Glioblastoma. Cancer Stem Cells. Neurospheres.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 PADRONIZAÇÃO DO VOLUME, QUANTIDADE E HIDRATAÇÃO DAS <i>HANGING DROPS</i>	37
FIGURA 2 MORFOLOGIA DOS AGREGADOS EM DIFERENTES TEMPOS DE CULTIVO EM <i>HANGING DROP</i>	38
FIGURA 3 TESTE PARA ESCOLHA DO SUBSTRATO NÃO ADERENTE.....	39
FIGURA 4 MORFOLOGIA DOS ESFEROIDES APÓS TEMPO DE CULTIVO EM <i>HANGING DROP</i> E <i>HANGING DROP</i> + SUBSTRATO NÃO ADERENTE.....	40
FIGURA 5 ENSAIO DE AVALIAÇÃO DE MORTE CELULAR NAS ESFERAS ESTABELECIDAS DURANTE PROTOCOLO DE CULTIVO EM <i>HANGING DROP</i> E <i>HANGING DROP</i> SEGUIDO DE CULTIVO EM SUBSTRATO NÃO ADERENTE.....	41
FIGURA 6 ESQUEMA DE CULTIVO PARA MARCAÇÃO DAS ESFERAS COM CD133 POR MICROSCOPIA CONFOCAL.....	42
FIGURA 7 ANÁLISE DA PRESENÇA DO MARCADOR CD133 NAS ESFERAS OBTIDAS PELO PLAQUEAMENTO EM <i>HANGING DROP</i> E EM <i>HANGING DROP</i> SEGUIDO DE CULTIVO EM SUBSTRATO NÃO ADERENTE, POLYHEMA.	44
FIGURA 8 EFEITO DO TRATAMENTO COM TMZ e SVA NA MORFOLOGIA DAS ESFERAS OBTIDAS APÓS METODOLOGIA <i>HANGING DROP</i> /POLYHEMA	48
FIGURA 9 EFEITO DO TRATAMENTO COM TMZ E SVA NA MORFOLOGIA DAS ESFERAS EM FORMAÇÃO POR METODOLOGIA <i>HANGING DROP</i>	49
FIGURA 10 MORFOLOGIA DOS AGREGADOS CELULARES FORMADOS EM MEIO NSC	52
FIGURA 11 ANÁLISE DA PRESENÇA DO MARCADOR CD133 NAS ESFERAS FORMADAS EM MEIO NSC.....	53
FIGURA 12 EFEITO DO TRATAMENTO COM TMZ E SVA NA MORFOLOGIA DAS ESFERAS EM MEIO NSC	55
FIGURA 13 ANÁLISE DA DUPLA MARCAÇÃO DE ANEXINA E PI POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DAS ESFERAS CULTIVADAS EM MEIO NSC.....	57

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES CD133, CD15 E SOX-2 APÓS PADRONIZAÇÃO DO CULTIVO EM <i>HANGING DROP</i> E EM <i>HANGING DROP</i> SEGUIDO DE CULTIVO EM SUBSTRATO NÃO ADERENTE.....	46
GRÁFICO 2 EFEITO DO TRATAMENTO COM TMZ E SVA NO CRESCIMENTO DAS ESFERAS OBTIDAS APÓS METODOLOGIA <i>HANGING DROP</i> /POLYHEMA	47
GRÁFICO 3 EFEITO DO TRATAMENTO COM TMZ E SVA NO TAMANHO DOS AGREGADOS CELULARES OBTIDOS DURANTE A FORMAÇÃO DE ESFERAS EM METODOLOGIA <i>HANGING DROP</i>	50
GRÁFICO 4 EFEITO DO TRATAMENTO COM TMZ E SVA NAS NEUROESFERAS FORMADAS EM NSC.....	55
GRÁFICO 5 ANÁLISE DE MORTE CELULAR INDUZIDA PELO TRATAMENTO COM TMZ E SVA NAS ESFERAS FORMADAS EM MEIO NSC.....	58
GRÁFICO 6 MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES CD133, CD15 E SOX-2 NAS ESFERAS FORMADAS EM MEIO NSC APÓS TRATAMENTO COM A COMBINAÇÃO DE TMZ E SVA.....	59
GRÁFICO 7 COMPARAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO ENRIQUECIMENTO EM CSCS NAS ESFERAS FORMADAS PELO PROTOCOLO <i>HANGING DROP</i> /POLYHEMA E PELO MEIO DEFINIDO NSC	60

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 SEQUÊNCIA DOS <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS.....	35
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALDH	- Aldeído Desidrogenase
ANOVA	- Análise de variância
BBB	- Blood Brain Barrier
BSA	- Soro Albumina Bovina
cDNA	- DNA complementar
CSCs	- Cancer Stem Cells
DMEM	- Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
FPP	- Farnesilpirofosfato
GBM	- Glioblastoma
GGPP	- Geranilgeranilpirofosfato
GST	- Glutathiona-S-transferase
HMBS	- Hidroximetilbilano sintase
HMG-CoA	- 3-Hidroxi-3-Metilglutaril Coenzima A
HPRT	- Hipoxantina Fosforibosil Transferase
INCA	- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
MGMT	- Metilguanina-DNA metiltransferase
mRNA	- RNA mensageiro
MRPs	- Multi-Drug Resistance Proteins
NSCs	- Neural Stem Cells
OMS	- Organização Mundial de Saúde
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase
Pgp	- Glicoproteína-p
PI	- Iodeto de Propídeo
Polyhema	- Poly2-hydroxyethyl methacrylate
qPCR	- PCR quantitativa
RNA	- Ácido Ribonucleico
SNC	- Sistema Nervoso Central
SNP	- Sistema Nervoso Periférico

SP	- Side Population
SVA	- Sinvastatina
TMZ	- Temozolomida

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	16
2.1.1	Objetivo Geral	16
2.1.2	Objetivos Específicos	16
3	REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1	CÂNCER	17
3.2	GLIOMA	17
3.3	CSC - CANCER STEM CELLS (CÉLULAS TRONCO TUMORAIS)	19
3.3.1	CSCs em Glioblastomas - GSCs	21
3.4	TRATAMENTOS ATUAIS	23
3.5	ESTATINAS	24
3.5.1	Sinvastatina	25
4	ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL	27
5	MATERIAL E MÉTODOS	28
5.1	SOLUÇÕES E MEIO DE CULTURA	28
5.1.1	PBS	28
5.1.2	Tripsina	28
5.1.3	Sinvastatina	28
5.1.4	Temozolomida	28
5.1.5	Meio DMEM A.G para células aderentes	28
5.1.6	Meio NSC para células em neuroesferas	29
5.1.7	Condições de Cultivo	29
5.2	LINHAGENS CELULARES	29
5.2.1	U87MG	29
5.3	ENRIQUECIMENTO DA SUBPOPULAÇÃO DE CSCS	30
5.4	PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO HANGING DROP PARA CULTIVO DE CÉLULAS TRONCO DE GLIOMA HUMANO	30
5.5	ANÁLISE DA FORMAÇÃO DAS ESFERAS EM HANGING DROPS	31
5.6	ANÁLISE DA FORMAÇÃO DAS ESFERAS EM HANGING DROP DURANTE O TRATAMENTO	31
5.7	ANÁLISE DA FORMAÇÃO DAS ESFERAS EM HANGING DROP APÓS TRATAMENTO	31

5.8	ANÁLISE DE MORTE CELULAR DAS ESFERAS EM HANGING DROP PADRONIZADAS	32
5.9	ANÁLISE DA PRESENÇA DO MARCADOR CD133 POR MICROSCOPIA CONFOCAL NAS ESFERAS EM HANGING DROP E POLYHEMA	32
5.10	PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE CULTIVO DE NEUROESFERAS EM MEIO NSC.....	32
5.11	ANÁLISE DA PRESENÇA DO MARCADOR CD133 POR MICROSCOPIA CONFOCAL NAS ESFERAS EM MEIO NSC	32
5.12	ENSAIO DE FORMAÇÃO DE NEUROESFERAS EM MEIO NSC	33
5.13	ANÁLISE DE MORTE CELULAR POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA ...	33
5.14	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MARCADORES DE CÉLULAS TRONCO TUMORAIS APÓS TERAPIA CONJUNTA DE TMZ + SVA	34
5.14.1	Extração de RNA Total.....	34
5.14.2	Síntese de cDNA.....	34
5.14.3	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR)	34
5.15	ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
6	APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
6.1	PADRONIZAÇÃO DO CULTIVO EM HANGING DROP	36
6.1.1	Morfologia durante o tempo de cultivo em gota e em substrato não aderente	39
6.2	ANÁLISE DA PRESENÇA DO MARCADOR CD133 POR MICROSCOPIA CONFOCAL NAS ESFERAS FORMADAS EM HANGING DROP E HANGING DROP SEGUIDO DE CULTIVO EM SUBSTRATO NÃO ADERENTE	42
6.3	ANÁLISE DA PRESENÇA DO MARCADOR CD133 POR PCR EM TEMPO REAL NAS ESFERAS EM HANGING DROP E EM HANGING DROP SEGUIDO DE CULTIVO EM POLYHEMA.....	45
6.4	ANÁLISE DO EFEITO DO TRATAMENTO DE TMZ E SVA NA FORMAÇÃO DAS ESFERAS EM HANGING DROP/POLYHEMA	46
6.5	ANÁLISE DO EFEITO DO TRATAMENTO COM TMZ E SVA DURANTE A FORMAÇÃO DAS ESFERAS EM HANGING DROP	48
6.6	PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE CULTIVO DE NEUROESFERAS EM MEIO NSC.....	50
6.6.1	Análise da formação de esferas em meio NSC	51
6.6.2	Análise da presença do marcador CD133 por Microscopia Confocal nas esferas formadas em meio NSC.....	52
6.6.3	Efeito do tratamento com TMZ e SVA em neuroesferas formadas em meio NSC ..	53
6.6.4	Análise de morte celular por microscopia de fluorescência das esferas em meio NSC	56

6.1	AVALIAÇÃO DA MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MARCADORES DE CÉLULAS TRONCO TUMORAIS NAS ESFERAS FORMADAS EM MEIO NSC APÓS TRATAMENTO COM TMZ E SVA	58
6.2	COMPARAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO ENRIQUECIMENTO EM CSCS NAS ESFERAS FORMADAS PELO PROTOCOLO HANGING DROP/POLYHEMA E PELO MEIO DEFINIDO NSC	59
7	DISCUSSÃO.....	61
8	CONCLUSÕES.....	68
	REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

O tecido cerebral é formado pelos neurônios e pelas células da glia. As células da glia são, nomeadamente, os astrócitos, oligodendrócitos, endotélio e células microgliais. Caso um tumor seja gerado a partir de um desses tipos celulares, esse tumor será genericamente chamado de glioma. Os gliomas são os tumores mais comuns derivados do Sistema Nervoso Central (SNC) e podem ser classificados de acordo com a célula que lhe deu origem em: oligodendroglioma, ependimoma e astrocitomas. Os astrocitomas, por sua vez, podem ser classificados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) de acordo com o grau de malignidade, que vai de grau I a IV. Dentre seus tipos, o de grau IV, também chamado de glioblastoma (GBM), é o mais agressivo e que apresenta pior prognóstico. Normalmente, os mais atingidos com esse tipo de tumor são pessoas de idade maior que 40 anos, do sexo masculino e de pele branca (JHANWAR-UNIYAL et al., 2015; OMURO, 2013; RASBAND, 2015; STUPP et al., 2014).

Atualmente, as modalidades terapêuticas para o glioblastoma consistem na retirada cirúrgica da massa tumoral, seguida de radioterapia e quimioterapia. No entanto, muitas vezes, devido ao rápido crescimento e invasão dos tecidos vizinhos, é praticamente impossível conseguir retirar cirurgicamente toda a massa tumoral sem causar danos neurológicos severos. Dessa forma, a terapia se baseia apenas nas sessões de radioterapia, seguidas de quimioterapia com o quimioterápico padrão temozolomida (TMZ), uma vez que um estudo realizado por Stupp e colaboradores em 2005 demonstrou que o uso adjunto desse fármaco aumentou estatisticamente o tempo de sobrevida dos pacientes em cerca de 2,5 meses (STUPP et al., 2005a). Nota-se, entretanto, que as estatísticas desses pacientes diagnosticados com glioblastoma continuam desanimadoras. Os pacientes possuem um tempo de sobrevida médio de cerca de 15 meses. Além disso, esse tumor apresenta altas taxas de resistência ao tratamento atual e altas taxas de recidiva, totalizando cerca de 90% dos casos (BEIER; SCHULZ; BEIER, 2011; JHANWAR-UNIYAL et al., 2015; POINTER et al., 2014; STUPP et al., 2005a; ZHANG; STEVENS; BRADSHAW, 2012).

Um dos motivos dessa agressividade demonstrada por esse tumor está relacionado à presença das células tronco tumorais (CSCs) e à hipótese de resistência mediada por essas células. Segundo essa hipótese, os tumores são formados por diferentes subpopulações de células, e dentre elas estão as CSCs. Essas células possuiriam propriedades de células tronco normais, como auto-renovação e habilidade para se diferenciar em múltiplas linhagens. Além disso, as CSCs apresentariam maior capacidade de reparo do DNA, maior tolerância a apoptose e menor taxa de proliferação (FULDA, 2013;

WANG, 2015). A presença dessas células já foi descrita em diferentes tipos de tumores, incluindo o glioblastoma. Dessa maneira, sugere-se que as terapias convencionais não são capazes de atingir e eliminar essa subpopulação, uma vez que tem como alvo as células já diferenciadas e com altas taxas de proliferação dentro da massa tumoral. O fato dessas células não estarem sendo atingidas explicaria os altos níveis de resistência e recorrência do GBM, por exemplo. Sendo assim, para que as terapêuticas atuais sejam mais eficientes é preciso que todas as células do tumor sejam alvo, inclusive as CSCs (CHEN; HUANG; CHEN, 2013; DENYSENKO et al., 2010; GUTMANN, 2014; KRESO; DICK, 2014; POINTER et al., 2014; WELLER et al., 2013).

Nesse sentido, a procura por terapias combinadas torna-se uma alternativa interessante aos tratamentos atuais. Com o intuito de identificar agentes para melhorar a terapia atual, Jiang e colaboradores publicaram um estudo no qual fizeram um *screening* de compostos que potencialmente poderiam ser rapidamente introduzidos em ensaios clínicos. Eles usaram linhagens celulares de GBM para os testes e puderam mostrar 22 fármacos que apresentaram atividade anti-GBM, dentre vários medicamentos já aprovados pelo órgão responsável pelo controle de medicamentos do governo americano, Food and Drug Administration (FDA). Os fármacos eram representantes de 5 classes de medicamentos, sendo que uma dessas classes era a das estatinas. O efeito citotóxico das estatinas já vem sendo estudado em diversos tipos de tumores, inclusive em gliomas, uma vez que um estudo correlacionou o uso das estatinas a uma menor incidência de gliomas (DEMIERRE et al., 2005; FERRIS et al., 2012; JIANG et al., 2014). Ainda nesse contexto, um estudo realizado por Fukai e colaboradores em 2014 observou um aumento do potencial antitumoral da temozolomida quando administrada em conjunto com o ácido zoledrônico, um agente também capaz de inibir a via do mevalonato, assim como as estatinas (FUKAI; KOIZUMI; NAKAO, 2014).

No entanto, apesar da ação anti-tumoral das estatinas parecer promissora, ainda não se sabe qual o seu efeito em células tronco tumorais de glioma. Interessantemente, dados do nosso grupo de pesquisa mostraram que linhagens de glioblastoma humano com diferença na responsividade à temozolomida são sensibilizadas quando expostas ao tratamento combinado de TMZ e SVA (Rafaela P. Gomes, dados não publicados), sendo interessante estudar a ação dessa combinação na subpopulação de células tronco.

Além disso, atualmente na literatura existe uma ampla discussão em relação aos efeitos do tratamento com a temozolomida isolada na subpopulação de células tronco tumorais. Um estudo conduzido por Beier e colaboradores em 2008 demonstrou que a temozolomida é capaz de atingir a população CD133⁺ (a presença desse marcador é uma

das características das CSCs), diminuindo as taxas de proliferação (BEIER et al., 2008). Em contrapartida, um estudo realizado por Liu e colaboradores mostrou que as células CD133⁺ de glioblastoma apresentou maior resistência a quimioterápicos, incluindo a TMZ, tendo sua viabilidade menos alterada quando expostas à TMZ, quando em comparação com as células CD133⁻ (LIU et al., 2006). Outro estudo também demonstrou que a sensibilidade à TMZ de células U251 de GBM humano sem propriedades de CSCs é maior quando comparada com células com características de CSCs (LI et al., 2015). Esses dados que entram em conflito na literatura pontuam a importância de se desenvolver mais investigações com o intuito de elucidar os efeitos que o quimioterápico padrão para o tratamento de GBM atualmente exerce nessa subpopulação de células com propriedades de células tronco.

2 OBJETIVOS

2.1.1 Objetivo Geral

Esse trabalho teve como objetivo geral a avaliação dos efeitos da terapia conjunta de temozolomida com sinvastatina na subpopulação de células tronco tumorais de linhagem de glioblastoma humano (U87MG).

2.1.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos do trabalho foram:

- a) Estabelecer uma metodologia para enriquecimento da população de CSCs: padronização da metodologia de cultivo em neuroesferas, padronização do método *hanging drop* para cultivo de células tronco de glioma humano.
- b) Avaliação da sensibilidade de CSCs de glioma ao tratamento combinado de TMZ + SVA: ensaio de formação de neuroesferas; ensaio de morte celular (Anexina/PI); análise de marcadores de CSCs no nível de mRNA.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CÂNCER

Câncer é o nome dado a um conjunto de doenças que se caracterizam pelo crescimento descontrolado das células, e que, em alguns casos, adquirem a capacidade de metastatizar outros tecidos. O câncer pode estar associado a fatores externos como: tabaco, organismos infecciosos, hábitos alimentares e estilo de vida não saudáveis, ou induzido por fatores internos, tais como: mutações genéticas hereditárias ou condições imunes e hormonais alteradas. Esses fatores também podem se somar para gerar essa condição patológica (INCA, 2016).

Para o ano de 2017 são esperados cerca de 1.688.780 novos casos de câncer nos Estados Unidos da América. Estima-se, ainda para 2017, que 600.920 americanos morram devido ao câncer, o que totaliza cerca de 1.650 mortes por dia (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016). No Brasil, estimativas do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) para o biênio de 2016-2017 registram que foram esperados 596.000 novos casos de câncer em 2016. Desses novos casos, estima-se que 5.440 sejam originados do Sistema Nervoso Central em homens e 4.830 em mulheres. Valores que correspondem a 5,50 e 4,68 novos casos a cada 100 mil homens e mulheres, respectivamente. Na região Sul do país, o câncer do SNC é o oitavo mais frequente em homens (10,44/ 100 mil) e o sexto (8,45/ 100 mil) entre as mulheres (sem considerar os tumores de pele não melanoma) (INCA, 2016). Atualmente existem mais de 100 tipos histologicamente distintos de tumores primários de cérebro e do SNC (AMERICAN BRAIN TUMOR ASSOCIATION, 2017). A taxa de sobrevida após o diagnóstico vai variar significativamente de acordo com a idade do paciente, histologia e marcadores moleculares presentes no tumor (SARKAR; CHIOCCA, 2012). Todos esses dados enfatizam a importância de se conduzirem estudos sobre a biologia tumoral com o intuito de melhor compreensão da doença e identificação de alvos moleculares importantes para o sucesso de abordagens terapêuticas.

3.2 GLIOMA

O SNC é formado pelos neurônios e pelas células da glia. Os neurônios têm a capacidade de gerar e propagar sinais químicos e elétricos, enquanto as células da glia oferecem suporte e nutrição aos neurônios, além de também possuírem funções sinalizadoras. Essas células são, nomeadamente, os astrócitos, oligodendrócitos, endotélio e as células microgliais (LENT, 2010; RASBAND, 2015). As células da glia,

assim como os neurônios, possuem tipos distintos com diferentes funções (RASBAND, 2015). Os astrócitos, por exemplo, são responsáveis pela regulação do fluxo sanguíneo e oxigenação local, e também pelo influxo de glucose sanguínea, conversão desta à lactato e liberação para os neurônios como fonte energética. Regulam a composição iônica e homeostase, além de participarem em muitos aspectos da função sináptica. São as células da glia em maior número no SNC (RASBAND, 2015). Os oligodendrócitos tem como papel principal a produção da bainha de mielina, que se enrolam nos axônios e permitem um impulso elétrico mais rápido. Esse mesmo papel é realizado pelas células de Schwann no Sistema Nervoso Periférico (SNP) (RASBAND, 2015). Já os ependimócitos são células epiteliais ciliadas que revestem os ventrículos e auxiliam na movimentação do líquido cefalorraquidiano (DEL BIGIO, 2010). E as células microgliais são as células do sistema imune residentes do tecido cerebral. Além disso, estudos recentes sugerem que esse tipo celular não está relacionado a apenas mecanismos de defesa, mas também em funções e desenvolvimento cerebral normal (RASBAND, 2015).

Os tumores gerados a partir de um desses 4 tipos celulares são chamados genericamente de glioma. Dentre os tumores derivados do SNC, os gliomas são os mais frequentes e fatais, representando cerca de 25% de todos os tumores primários do SNC e 74,6% de todos os tumores malignos (INCA, 2016; JHANWAR-UNIYAL et al., 2015; SARKAR; CHIOCCA, 2012).

Os gliomas podem ser classificados de acordo o tipo celular em que teve origem e também baseando-se em sua morfologia e características clínicas em: astrocitomas, oligodendrogliomas, ependimomas, gliomas mistos e ainda outras variantes histológicas raras. Por sua vez, os astrocitomas possuem, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), graus de malignidade, que vão de I a IV, nomeadamente, grau I ou astrocitoma pilocítico, grau II ou astrocitoma de baixo grau (AGII), grau III ou astrocitoma anaplásico (AGIII) e grau IV ou glioblastoma (GBM). Os astrocitomas de grau I não são infiltrativos e acometem normalmente crianças. Já os de grau II são tumores de baixa taxa de crescimento, porém podem se transformar e obter um fenótipo mais agressivo, e maior grau de classificação (SOCIEDADE BRASILEIRA DE ONCOLOGIA CLÍNICA (SBOC), 2011; STUPP et al., 2014). Os astrocitomas de grau III e IV, por sua vez, são comumente chamados de gliomas malignos, possuindo menores médias de sobrevida em relação aos de menor grau, sendo que o de grau III apresenta taxas de 3,5 anos e o de grau IV aproximadamente 15 meses (STUPP et al., 2014).

Dentre esses subtipos, o GBM é o mais frequente e fatal, correspondendo a 65% dos gliomas. O GBM é responsável por aproximadamente 3 casos a cada 100.000 pessoas

por ano nos Estados Unidos, totalizando aproximadamente 12.000 novos casos de GBM diagnosticados anualmente (JHANWAR-UNIYAL et al., 2015; POINTER et al., 2014). Esse tipo de tumor acomete com maior frequência na faixa etária adulta, entre os maiores de 40 anos e é mais comum no sexo masculino (JHANWAR-UNIYAL et al., 2015; OMURO, 2013). O GBM possui um alto nível de heterogeneidade intra e intertumoral, além de uma alta capacidade de infiltração dos tecidos cerebrais normais que os cercam (POINTER et al., 2014).

A maior barreira para o tratamento do glioma é, provavelmente, o seu alto poder invasivo. E juntamente a esse comportamento agressivo, esse tipo de tumor mostra uma alta resistência à quimioterapia e radioterapia, o que resulta em altas taxas de recorrência da doença e poucos benefícios com os tratamentos atuais. As modalidades terapêuticas atuais incluem: a cirurgia (algumas vezes limitada pela localização em área eloquente do cérebro), a radioterapia e a quimioterapia (OMURO, 2013; STUPP et al., 2014). Sendo o quimioterápico padrão a Temozolomida (TMZ). Entretanto, mesmo com os avanços e estudos que buscam melhorar a terapêutica oferecida, a média de sobrevida dos pacientes diagnosticados continua baixa, entre 12 a 14,6 meses. A taxa de sobrevida de 5 anos em pacientes com GBM é menor que 5%. Essas estatísticas destacam a necessidade de buscar novas estratégias terapêuticas a fim de melhorar a qualidade de vida dos pacientes diagnosticados com essa doença (BEIER; SCHULZ; BEIER, 2011; COMISSÃO NACIONAL DE INCORPORAÇÃO DE TECNOLOGIAS NO SUS – CONITEC –, 2014; JHANWAR-UNIYAL et al., 2015; POINTER et al., 2014).

3.3 CSC - CANCER STEM CELLS (CÉLULAS TRONCO TUMORAIS)

Os gliomas apresentam altas taxas de resistência aos tratamentos atuais, além de altas taxas de recidiva, totalizando cerca de 90% dos casos, e uma justificativa apresentada para esse quadro está relacionada com a hipótese de resistência mediada por células tronco tumorais. As células tronco estão geralmente atreladas à sua função crítica na regeneração e manutenção de organismos multicelulares, porém, na última década, estudos sugeriram que essas células também estão envolvidas no desenvolvimento, crescimento e recidiva de tumores (CHEN; HUANG; CHEN, 2013; DENYSENKO et al., 2010; POINTER et al., 2014; WELLER et al., 2013).

Assim como as células tronco normais, as células tronco tumorais (em inglês CSC – Cancer Stem Cells) caracterizam-se por suas propriedades de auto-renovação e habilidade para se diferenciar em múltiplas linhagens (JHANWAR-UNIYAL et al., 2015; POINTER et al., 2014; WAN et al., 2010). Sabe-se que as CSCs têm um papel crítico na iniciação,

sustentação, recorrência e metástase do tumor, além da resistência deste aos tratamentos convencionais (CHEN; HUANG; CHEN, 2013; CLEVERS, 2011; ISCHENKO et al., 2008; JONES; MATSUI; SMITH, 2004; JORDAN; GUZMAN; NOBLE, 2008; KORKAYA; WICHA, 2007; WICHA; LIU; DONTU, 2006). As CSCs ainda apresentam maior capacidade de reparo do DNA, maior tolerância a apoptose e menor taxa de proliferação (FULDA, 2013; WANG, 2015). No entanto, as terapias convencionais não são capazes de atingir e eliminar essa subpopulação, o que explicaria os altos níveis de resistência e recorrência do GBM (WAN et al., 2010).

Na década de 90, a hipótese das células tronco tumorais para leucemia e linfoma foi estabelecida por Dick e colaboradores. Essa hipótese propõe que os tumores são formados por distintas subpopulações, sendo que uma delas possui propriedades de células tronco, as CSCs, as quais se mostram mais resistentes à quimioterapia e radioterapia, quando comparadas às subpopulações que são diferenciadas (BEIER; SCHULZ; BEIER, 2011; IACOPINO et al., 2014; O'CONNOR et al., 2014; POINTER et al., 2014; SCHWARZ-CRUZY-CELIS; MELÉNDEZ-ZAJGLA, 2006). Já em 2003, foi pela primeira vez estudado o modelo das CSCs em tumores sólidos, no caso em câncer de mama. Esses estudos seguiram abrangendo outros tipos de tumores, incluindo câncer de cabeça e pescoço, pulmão, próstata, cérebro, entre outros (KRESO; DICK, 2014). A hipótese das CSCs também sugere que apenas as terapias que eliminam eficientemente essa subpopulação são capazes de induzir respostas a longo prazo e deter a progressão do tumor. Sendo assim, a erradicação das CSCs se faz necessária para impedir a expansão tumoral e prevenir a recidiva após o tratamento (BEIER; SCHULZ; BEIER, 2011; O'CONNOR et al., 2014; POINTER et al., 2014). Alguns pesquisadores chamam essa subpopulação de "células iniciadoras de tumor" ao invés de CSCs, devido justamente a essa capacidade das células em formarem um tumor. E ainda, para o modelo de glioma, existe uma linha que sugere que deve haver uma outra nomenclatura, subdividindo essas células de acordo com seu papel na formação, manutenção ou progressão do tumor, chamando-as de "células iniciadoras de tumor", (glioma initiating stem cells (GISCs)), "células mantenedoras de tumor" (glioma maintaining stem cells (GMSCs)) e ainda as glioma-associated stem cells (GASCs), que seriam células recrutadas, que poderiam ser originadas de outro local que não o parênquima cerebral ou de outros nichos de células tronco de dentro do sistema nervoso central (GUTMANN, 2014; KRESO; DICK, 2014). Nesse trabalho iremos identificá-las globalmente como CSCs.

3.3.1 CSCs em Glioblastomas - GSCs

A presença de CSCs em GBM é detectada por meio de marcadores moleculares específicos e através do uso de condições de cultivo que foram desenvolvidos originalmente para células tronco neurais normais. As NSCs (Neural Stem Cells - Células Tronco Neurais) crescem *in vitro* como agregados de células, formando neuroesferas, as quais possuem a habilidade de se diferenciar em vários tipos de células cerebrais. Essas células tronco possuem, ainda, habilidade de formar novas neuroesferas (JHANWAR-UNIYAL et al., 2015).

Atualmente o modelo mais utilizado para a análise do comportamento celular é o 2D, o qual apresenta baixa reprodutibilidade, não mimetiza um ambiente *in vivo*, além de não permitir a formação das neuroesferas. Sendo assim esse modelo não é o ideal para estudos da subpopulação de CSCs (ANTONI et al., 2015; NETO et al., 2015; VAN MOORST; DASS, 2011). Para poder explorar essa característica das CSCs de formar neuroesferas, recomenda-se o cultivo em modelos 3D. Dessa forma, as neuroesferas podem ser cultivadas por várias metodologias que utilizam substratos não aderentes, meios de cultura definidos, crescimento em constante movimento e ainda por meio das *hanging drops* (NETO et al., 2015).

Em diversos tipos de tumores de cérebro, incluindo GBM, foi visto que as CSCs expressam o marcador molecular CD133, também chamada de Prolinina-1, o qual pode ser detectado por meio de anticorpos específicos. CD133 é uma glicoproteína transmembrana expressa em uma variedade de tecidos, incluindo o cérebro, porém sua função, tanto fisiológica quanto patológica, continua desconhecida. Existe uma sugestão de que CD133 seria importante para a manutenção da composição lipídica da membrana plasmática, já que foi vista uma interação entre CD133 e colesterol em microdomínios de membrana (lipidrafts) (CORBEIL et al., 2010; LI, 2013; WAN et al., 2010). As CSCs de GBM foram originalmente identificadas através desse marcador. Wu e colaboradores, em 2008, isolaram populações de células CD133⁺ e CD133⁻ de uma linhagem de glioma de camundongos, GL261. Através de injeções intracraniais em camundongos, observaram que com menos de 100 células GL261 CD133⁺ havia formação de tumor nos animais, enquanto eram necessárias 10.000 células GL261 CD133⁻ para iniciar um tumor (WU; ALMAN, 2008).

Pelas evidências cumulativas de que células CD133⁻ também são capazes de formar tumores quando injetadas no cérebro de ratos ou camundongos e que podem apresentar propriedades de células tronco, o uso exclusivo de CD133 não é confiável e recomendado como marcador de células tronco tumorais (DAHLROT et al., 2014; JHANWAR-UNIYAL et al., 2015; LI, 2013; KAHLERT).

Nesse sentido, outros marcadores moleculares podem ser utilizados para que, em conjunto com o CD133, possam oferecer uma predição de CSCs mais confiável. Utiliza-se comumente os marcadores Sox-2 (SRY-related HMG-box gene 2), Musashi-1 (Msi-1), CD44 e nestina. Relatos da literatura mostram que esses quatro marcadores estão expressos em altos níveis em células tronco neurais (BRADSHAW et al., 2016; GUTMANN, 2014; IACOPINO et al., 2014). Ainda, estudos relacionam a marcação de CD15 a esse fenótipo de células tronco em gliomas. Esse marcador é também chamado de SSEA1 (stage-specific embryonic antigen 1), e está presente em diversos tipos de células tronco pluripotentes, incluindo células neurais (KAHLERT et al., 2012; MAO et al., 2009; SON et al., 2009).

Além disso, expressões de CD133 em conjunto com outro marcador, a nestina, mostraram significância como marcador de prognóstico de glioma, enquanto que expressão de Musashi mostrou uma tendência como potencial marcador de prognóstico (DAHLROT et al., 2013). A nestina é um filamento expresso em células neurais progenitoras durante o desenvolvimento. Em cérebros adultos humanos, a nestina é expressa apenas em células tronco neurais. A nestina tem sido identificada em vários tipos de câncer, incluindo gliomas, nos quais a sua expressão está atrelada a um fenótipo de desdiferenciação, ao aumento de motilidade da célula, ao potencial invasivo e ao aumento da malignidade (DAHLROT et al., 2013, 2014; ZHANG et al., 2008).

Outra forma de contornar a inexistência de marcadores exclusivos e específicos para isolar CSCs pode ser alcançada através do ensaio com o corante HOECHST 33342. Esse é um corante fluorescente que se liga a regiões ricas em AT do DNA. O influxo desse corante ocorre em todas as células, no entanto o padrão de efluxo é menos permissivo. Células que conseguem fazer o efluxo desse corante foram descritas pela primeira vez em medula óssea de camundongos e podem ser isoladas através de um citômetro de fluxo, usando dois comprimentos de onda (WAN et al., 2010). Essas células com capacidade de expelir o corante são chamadas de *Side Population* (SP). Em tecidos normais, as células SP apresentam altas expressões de genes relacionados a propriedades de células tronco, nomeadamente, Notch-1, Musashi-1 e β -catenina, e ainda apresentam potencial de diferenciação. Em tecidos tumorais, as células SP foram encontradas com frequência variando de 0 a 20% da população total (WAN et al., 2010). Em linhagens de gliomas, a proporção de células SP encontrada foi de 0.04 a 1.34%, sendo que essas células são mais tumorigênicas e invasivas quando comparadas às não-SP, além de apresentarem aumento na expressão de nestina, musashi-1 e ABCG2 (WAN et al., 2010).

Ainda, estudos mostraram que a expressão da enzima ALDH (aldeído desidrogenase) também está aumentada na subpopulação de células tronco tumorais,

inclusive de gliomas, demonstrando ser um marcador de prognóstico relevante. Essa marcação pode ser feita através do ensaio Aldefluor, no qual se verifica o aumento da atividade da enzima (ALLAHVERDIYEV; BAGIROVA; OZTEL, 2012; NAKANO, 2015).

3.4 TRATAMENTOS ATUAIS

A prática terapêutica atual para o GBM baseia-se em 3 grupos básicos: cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Dessas práticas, a radioterapia é a que oferece maiores benefícios na sobrevida dos pacientes e, portanto, é a mais indicada para os pacientes após a cirurgia. No entanto, estudos comprovaram que a radioterapia junto ao quimioterápico temozolomida aumenta a média de sobrevida de 12.1 para 14.6 meses, quando comparado a radioterapia por si só, sendo uma estratégia válida e amplamente utilizada como tratamento padrão atualmente (STUPP et al., 2005b; WANG et al., 2015).

A temozolomida (TMZ) é uma molécula pequena (194Da) e lipossolúvel, capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (BBB – blood brain barrier) e que pertence à classe de fármacos imidazotetrazina. A TMZ é uma pró-droga, estável em pH ácido, o que permite sua administração via oral. Em pH 7.4 seu tempo de meia vida é de 1.8 horas. Sua ação citotóxica nas células se dá por ser um agente alquilante de DNA, transferindo grupamentos metil nas posições O(6) e N(7) da guanina e N(3) da adenina, induzindo um pareamento de bases errado, parada de ciclo e indução de morte celular. Há uma faixa de pH, perto dos valores fisiológicos, na qual ocorre a ativação da TMZ e a transferência do grupamento metil. Tumores de cérebro possuem um pH mais básico que o tecido normal, o que acaba favorecendo a ativação da pró-droga no tecido tumoral (COMISSÃO NACIONAL DE INCORPORAÇÃO DE TECNOLOGIAS NO SUS – CONITEC –, 2014; ZHANG; STEVENS; BRADSHAW, 2012). No entanto, apesar de ser o fármaco padrão para o tratamento de gliomas, existem casos de resistência à TMZ. Essa resistência pode ser justificada pela presença de proteínas MRPs (multi-drug resistance proteins), MGMT (Methylguanine-DNA methyltransferase) e GST (glutathione-S-transferase). Estudos comprovaram que a expressão de MDR1/ABCB1 que codifica para a glicoproteína-p (Pgp) tem impacto negativo na sensibilização de gliomas à ação da TMZ, uma vez que essa proteína tem a capacidade de exportar o fármaco para fora das células tumorais, inviabilizando seu efeito (ZHANG; STEVENS; BRADSHAW, 2012).

Apesar da sua grande importância no tratamento de gliomas, ainda não há um consenso na literatura quanto aos efeitos da TMZ, e outros fármacos quimioterápicos, na sensibilização de GSCs, tanto *in vivo* como *in vitro* (BEIER et al., 2008; BEIER; SCHULZ; BEIER, 2011; LI et al., 2015). Um estudo realizado por Bleau e colaboradores em 2009

demonstrou um aumento da tumorigenicidade de células de glioma murino após tratamento com temozolomida à longo prazo (BLEAU et al., 2009). Além disso, um estudo conduzido por Chua e colaboradores em 2008 mostrou que houve um aumento da população de células SP em células de GBM humano após tratamento com temozolomida (CHUA et al., 2008). Já em um estudo realizado por Beier e colaboradores, em 2008, a TMZ teve como efeito uma diminuição da subpopulação de células tronco tempo-concentração dependente, em linhagens celulares de GBM. Esse efeito foi distinto em diferentes tipos de linhagens. Foi observado que em linhagens CSC de GBM que expressavam MGMT, uma enzima que é capaz de retirar os grupamentos metil inseridos pela TMZ para gerar sua ação citotóxica, a concentração necessária para o efeito inibitório da TMZ era 10 vezes maior quando comparado a linhagens CSC de GBM que não expressavam a enzima MGMT. Esse resultado indica que a eficiência da TMZ estaria relacionada à expressão dessa enzima de reparo (BEIER et al., 2008).

3.5 ESTATINAS

Uma vez que as terapias atuais apresentam falhas, se torna cada vez mais importante a procura de novos compostos que tenham ação citotóxica aos gliomas. Com o intuito de identificar agentes para melhorar a terapia atual, Jiang e colaboradores publicaram um estudo no qual fizeram um *screening* de compostos que potencialmente poderiam ser rapidamente introduzidos em ensaios clínicos. Eles usaram linhagens celulares de GBM para os testes e puderam mostrar 22 fármacos que apresentaram atividade anti-GBM dentre vários medicamentos já aprovados pelo órgão responsável pelo controle de medicamentos do governo americano, Food and Drug Administration (FDA). Esses compostos eram, nomeadamente, bloqueadores serotoninérgicos, antineoplásicos, anti-infecciosos, anti-inflamatórios, moduladores hormonais e agentes anti-hiperlipidêmicos (estatinas) (JIANG et al., 2014).

Ainda nesse contexto, um estudo realizado entre julho de 2007 a janeiro de 2010 com 517 pacientes diagnosticados com glioma mostrou uma associação inversa entre a doença e o uso de sinvastatina e lovastatina (FERRIS et al., 2012). Tanto a sinvastatina como a lovastatina são classificadas como estatinas. As estatinas fazem parte de uma classe de drogas mundialmente conhecida por diminuir os níveis de colesterol e reduzir o risco de acidentes cardio e cerebrovasculares. Seu mecanismo de ação é através da inibição competitiva da enzima HMG-CoA redutase, responsável por catalisar uma etapa limitante na via de síntese do colesterol, convertendo HMG-CoA a mevalonato (CHAN; OZA; SIU, 2003; DEMIERRE et al., 2005).

As estatinas, ao inibirem a biossíntese do mevalonato, também interferem negativamente na formação de intermediários isoprenoides, como farnesilpirofosfato (FPP – farnesylpyro phosphate) e geranilgeranilpirofosfato (GGPP - geranylgeranylpyrophosphate). Esses intermediários desempenham um papel essencial para o direcionamento e ancoragem de várias proteínas, inclusive de algumas proteínas oncogênicas, como Ras (DEMIERRE et al., 2005).

3.5.1 Sinvastatina

A sinvastatina (SVA) está entre os fármacos mais comercializados nos Estados Unidos da América, com o nome comercial de Zocor (KING, 2013). Dados na literatura relacionam seu uso a um potencial anti-tumoral (KIKUCHI; NAGATA; ABE, 1997; WU et al., 2009). Kikuchi e colaboradores em 1997 relataram que o uso da sinvastatina em linhagens de glioma humano modificou a morfologia celular e reduziu o potencial proliferativo (KIKUCHI; NAGATA; ABE, 1997).

Em um estudo do nosso grupo de pesquisa foram verificados os efeitos da sinvastatina na diminuição da viabilidade e capacidade de migração, alterações de morfologia, aumento no conteúdo de DNA fragmentado, indicando morte celular, e parada de proliferação nas linhagens de GBM humano U87MG e T98G (KENSKI, 2013).

Outros dados, de Yongjun e colaboradores, mostraram que o tratamento com atorvastatina promove redução nos efeitos pró-tumorigênicos da micróglia na migração e invasão de gliomas, através da redução da expressão de MT1-MMP (YONGJUN et al., 2013).

Na literatura não existem estudos que utilizem a combinação de TMZ com SVA. No entanto, há um ensaio clínico da Arábia Saudita em fase II, que iniciou o recrutamento em janeiro de 2014, com previsão de resultados para o meio de 2017 e começo de 2018. Nesse estudo eles utilizam a combinação de radioterapia com TMZ e uma droga da classe das estatinas, a atorvastatina, em pacientes com diagnóstico de GBM ou variantes (ALTWAIRGI, 2015).

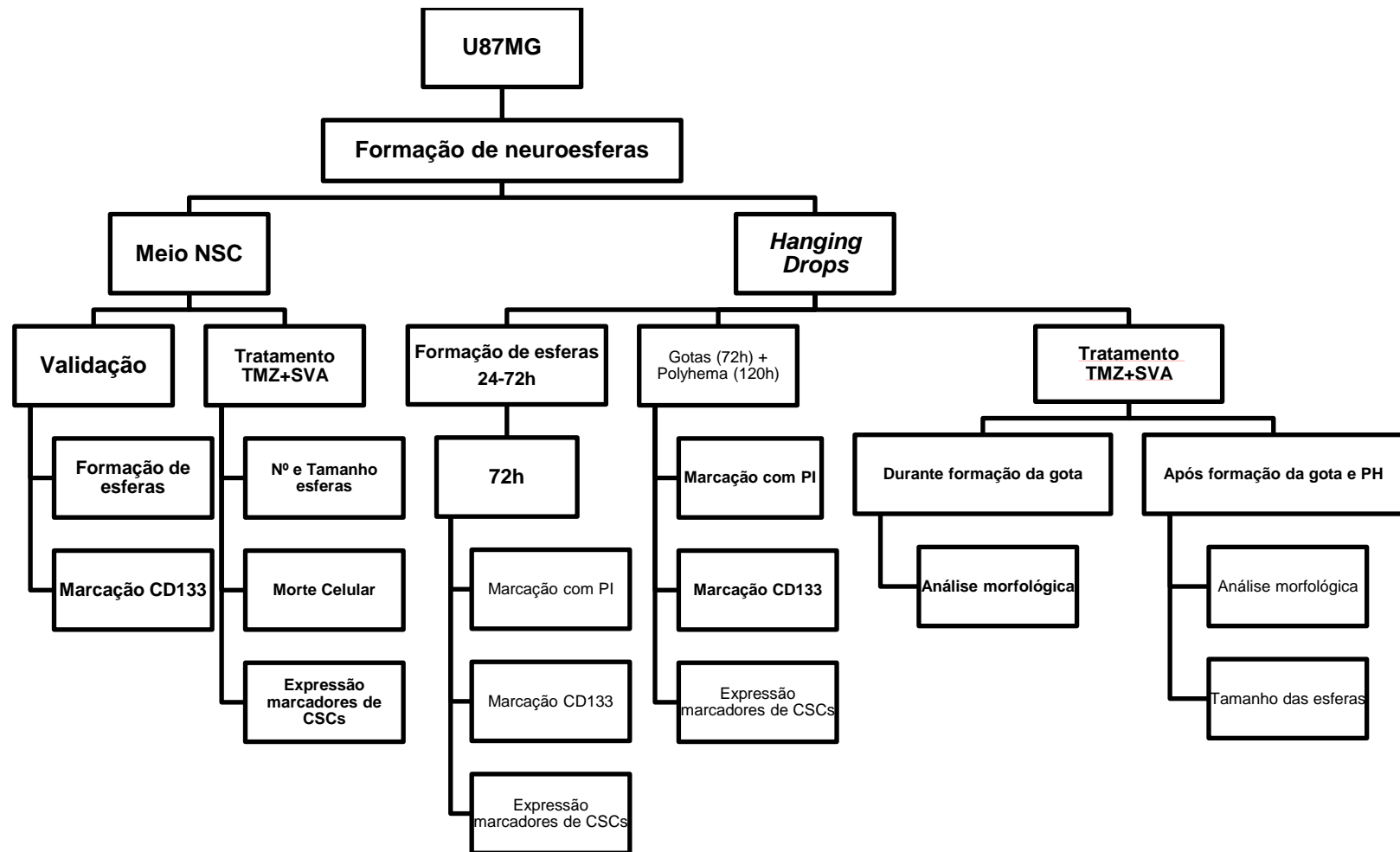
Além disso, um estudo da Alemanha também avaliou a ação da atorvastatina com a temozolomida. Em um encontro da sociedade de neurocirurgia de junho de 2015 foi divulgado um resumo do estudo com os resultados de um ensaio de proliferação, tratando as linhagens de GBM U87MG e LN405 por 72 horas, e foi visto que combinando TMZ com atorvastatina houve um aumento no efeito anti-tumoral da TMZ em 44.7% (YILDIZ et al, 2015).

Ainda, um estudo recente de Oliveira e colaboradores, em 2017, relatou que o uso da atorvastatina diminuiu a viabilidade de células A172 de glioma humano, porém não mostrou efeito aditivo quando em conjunto com a TMZ. Mostraram ainda que tanto a terapia isolada, quanto a conjunta foi capaz de diminuir a migração celular. E que a atorvastatina aumentou o processo de morte programada, apoptose, sendo seu efeito potencializado quando utilizada em combinação com a TMZ (OLIVEIRA et al., 2017).

No nosso grupo de pesquisa, através de dados obtidos pela doutoranda Rafaela Pino Gomes, foi visto que existe uma diferença na sensibilidade ao tratamento com TMZ e SVA entre distintas linhagens de GBM humano. A linhagem U87MG, que não expressa a enzima de reparo MGMT, é sensível ao tratamento com TMZ, sofrendo queda na viabilidade, e tem sua sensibilidade aumentada quando tratada com a terapia conjunta de TMZ e SVA. Já a linhagem T98G se apresenta resistente à TMZ, uma vez que expressa altos níveis da enzima MGMT, porém, quando tratada com TMZ e SVA apresenta queda na viabilidade celular, demonstrando a efetividade da terapia combinada e incentivando estudos subsequentes.

Tendo isso em vista, pesquisar os efeitos da TMZ em combinação com a SVA poderia resultar em uma diminuição de doses da terapia atual e justifica estudos *in vitro* e *in vivo* com essa combinação. Além disso, apesar de se ter informações que suportam seu potencial anti-tumoral, não se sabe quais os efeitos dessa combinação em células tronco tumorais, o que reforça a importância desse projeto.

4 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL



(Tratamento:TMZ: 100 μ M + SVA: 1 μ M- 72 horas)

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 SOLUÇÕES E MEIO DE CULTURA

5.1.1 PBS

A solução salina-fosfato tamponada (PBS) foi preparada como uma solução estoque concentrada cinco vezes, sendo que esta solução estoque é constituída por 680 mmol/L de NaCl, 13,4 mmol/L de KCl e 40,5 mmol/L de Na_2HPO_4 . Esta também teve seu pH ajustado para 7,4, sendo esterilizada em autoclave da marca Fanem a 120°C, durante 45 minutos, sob pressão de 1 atm e armazenada em temperatura ambiente ou a 4°C.

5.1.2 Tripsina

A solução de tripsina-EDTA utilizada para soltar as células cultivadas de forma aderente nas garrafas constitui-se de 137 mmol/L de NaCl, 5,4 mmol/L de KCl, 5 mmol/L de glucose, 0,42 mmol/L de Na_2HPO_4 , 0,44 mmol/L de KH_2PO_4 , 2,3 mmol/L de NaHCO_3 , 0,53 mmol/L de EDTA e 50 mg/L de tripsina, e teve seu pH ajustado para 7,4. O indicador de pH utilizado foi o vermelho de fenol 15 mg/L. Esta solução foi esterilizada por filtração em membrana estéril com poro de 0,22 μm (Millipore) sob pressão em aparelho Sartorius, em câmara de fluxo laminar vertical (VECO) e armazenada a -20°C.

5.1.3 Sinvastatina

A solução estoque de sinvastatina, Zocor® da MERCK, foi preparada na concentração de 0,1M, diluída em etanol puro (veículo), e armazenada a temperatura de -20°C. Para os experimentos, a solução foi diluída em meio de cultura a fim de atingir a concentração desejada de 1 μM .

5.1.4 Temozolomida

A solução estoque de temozolomida foi preparada na concentração de 100 mM, diluída em dimetilsulfóxido (DMSO) e estocada a temperatura de 4°C. Para os experimentos, a solução foi diluída em meio de cultura a fim de atingir a concentração desejada de 100 μM .

5.1.5 Meio DMEM A.G para células aderentes

O meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) alta glucose (Sigma) foi reconstituído em água ultra-pura e teve seu pH ajustado em 7,4. O ajuste do pH do meio

foi realizado pela adição de NaHCO_3 estéril (autoclavado). O meio foi esterilizado por filtração em membrana de aceto-nitrato de celulose com poro de 0,22 μm . sob pressão em aparelho Sartorius, em câmara de fluxo laminar vertical (VECO). Para os experimentos, o meio DMEM alta glucose foi suplementado com 10% de soro fetal bovino estéril (SFB; Gibco) e 100 $\mu\text{g/mL}$ do antibiótico estreptomicina e 100 U/mL de penicilina.

5.1.6 Meio NSC para células em neuroesferas

O meio de cultura para as células cultivadas em neuroesferas (NSC) compõe-se de DMEM/F-12 suplementado com 2% do componente B27, 20ng/mL de FGF e 20ng/mL de EGF e 100 $\mu\text{g/mL}$ do antibiótico estreptomicina e 100 U/mL penicilina.

5.1.7 Condições de Cultivo

A linhagem U87MG foi cultivada como cultura aderente em garrafas plásticas (poliestireno) estéreis, mantidas com meio de cultura (DMEM alta glucose) suplementado com 10% soro fetal bovino e penicilina e estreptomicina. As células foram mantidas em estufa a 37°C, sob atmosfera contendo 5% de CO_2 . A subcultura foi realizada de acordo com a confluência das células, sendo utilizada a solução salina-fosfato tamponada (PBS 1X) para lavagem, e em seguida a solução de tripsina-EDTA para o desprendimento das mesmas.

Essa mesma linhagem foi também cultivada em neuroesferas. Para isso as placas e garrafas utilizadas foram recobertas com Polyhema, (Poly(2-hydroxyethyl methacrylate)), um composto que impede a aderência das células e promove o enriquecimento da população de células tronco em cultivo. Esse composto foi dissolvido em álcool 95%, na proporção 1.2% (massa/volume). O meio de cultivo utilizado foi o meio DMEM/F-12 suplementado com B27, FGF (Fibroblast growth factors) e EGF (Epidermal growth factor) (meio NSC).

5.2 LINHAGENS CELULARES

5.2.1 U87MG

As células U87MG pertencem à linhagem de glioma de grau IV (GBM), isoladas de um paciente do sexo masculino e de idade desconhecida. Essa linhagem foi cedida pela Profª Drª Mari Cleide Sogayar, do Núcleo de Terapia Celular e Molecular (NUCEL/NETCEM) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM-USP), e foi sequenciada e validada pelo laboratório da Profª Suely Kazue Nagahashi Marie, da Faculdade de Medicina da USP (FM-USP).

5.3 ENRIQUECIMENTO DA SUBPOPULAÇÃO DE CSCS

A padronização do cultivo das células de GBM em neuroesferas foi realizada com o intuito de enriquecer a cultura em células tronco tumorais para depois serem realizados os devidos tratamentos. Sendo assim, foram testadas diferentes formas de cultivo dessas esferas. O método de *hanging drop* foi utilizado, plaqueando as células com o meio DMEM A.G, e em seguida as esferas formadas nas gotas foram realocadas em substrato não aderente (polyhema). Além disso, foi realizado o cultivo de esferas em meio definido (NSC) em substrato não aderente (polyhema) - maneira de cultivo mais relatada na literatura para a finalidade de enriquecimento. Ainda, com o intuito de analisar, a partir de marcadores de CSCs por Real Time, o enriquecimento promovido com o meio NSC e confrontar com o uso do meio DMEM A.G, foi realizado o cultivo das células em meio DMEM A.G em substrato não aderente (polyhema).

5.4 PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO *HANGING DROP* PARA CULTIVO DE CÉLULAS TRONCO DE GLIOMA HUMANO

O cultivo em *hanging drop* foi realizado a partir da padronização obtida pela aluna Melissa Mara da Silva em seu trabalho de conclusão de curso (TCC, UniBrasil). Nele, foram testados diferentes fatores como: número de células por gota em suspensão (20, 40, 60, 80, 100, 200, 500 e 1000 células), volume de gotas (entre 20µL e 50µL), tempo de formação de esferas (24, 48 e 72 horas) e meio de cultivo, sendo eles com e sem soro fetal bovino, com e sem antibióticos (penicilina e estreptomicina), com e sem HEPES (SILVA, 2016). As células foram plaqueadas em gotas, utilizando uma pipeta multicanal, em tampas de placas plásticas de 100 mm, sendo que cada placa continha 49 gotas. Ao fim do plaqueamento, as tampas eram invertidas novamente e as placas incubadas na estufa a 37°C, sob atmosfera contendo 5% de CO₂, pelo tempo desejado para cada teste. O crescimento foi acompanhado através da observação das gotas em Microscópio Carl Zeiss modelo Axiovert 40 e as fotos foram obtidas utilizando câmera Zeiss Axio Cam MR. Depois de formadas as esferas, estas foram transferidas para placas recobertas com Poly(2-hydroxyethyl methacrylate (polyhema)) e mantidas por 5 dias, a fim de fortalecer as interações célula-célula. O polyhema foi dissolvido em álcool 95% na proporção 1.2% (massa/volume). O meio de cultivo utilizado para o plaqueamento e a manutenção das gotas foi o mesmo que para a condição aderente (DMEM A.G).

5.5 ANÁLISE DA FORMAÇÃO DAS ESFERAS EM *HANGING DROPS*

Foram plaqueadas 49 gotas contendo 1000 células/gota, utilizando uma pipeta multicanal, em 3 tampas de placas plásticas de 100 mm, cada placa destinada a um tempo de 24-72h. Ao fim do plaqueamento as tampas eram invertidas e as placas incubadas na estufa a 37°C, sob atmosfera contendo 5% de CO₂, durante 24-72h. Após os determinados tempos de formação, foram tiradas fotos utilizando câmera Zeiss Axio Cam MR e a média de tamanho das esferas foi contabilizada.

5.6 ANÁLISE DA FORMAÇÃO DAS ESFERAS EM *HANGING DROP* DURANTE O TRATAMENTO

O plaqueamento de 49 gotas/placa com 1000 células/gota foi realizado em 6 tampas de placas plásticas de 100 mm. Em cada uma das placas foi realizado o tratamento com as condições determinadas: DMSO, Etanol, DMSO+Etanol, TMZ, SVA e TMZ+SVA. O plaqueamento foi realizado com meio de cultivo já contendo os tratamentos. Ao fim do plaqueamento, as tampas foram invertidas e as placas incubadas na estufa a 37°C, sob atmosfera contendo 5% de CO₂, durante 72h. Após as 72h, foram tiradas fotos utilizando câmera Zeiss Axio Cam MR e a média de tamanho das esferas foi analisada.

5.7 ANÁLISE DA FORMAÇÃO DAS ESFERAS EM *HANGING DROP* APÓS TRATAMENTO

Foram plaqueadas 30 gotas contendo 1000 células/gota, utilizando uma pipeta multicanal, em 6 tampas de placas plásticas de 100 mm. Ao fim do plaqueamento as tampas eram invertidas e as placas incubadas na estufa a 37°C, sob atmosfera contendo 5% de CO₂, durante 72h. Os agregados formados nas gotas foram realocadas em placas de 100mm³ já recobertas com Polyhema 1.2% em meio DMEM A.G. Essas esferas foram mantidas na estufa, sob as mesmas condições já mencionadas anteriormente, durante 120h. Passadas as 120h em substrato não aderente, foi destinada uma placa de 100mm³ para cada condição de tratamento (DMSO, Etanol, DMSO+Etanol, TMZ, SVA, TMZ+SVA) e seus meios foram substituídos por meio de cultivo já com os tratamentos. Essas células foram submetidas ao tratamento por mais 72h e novamente fotos foram obtidas e as médias de tamanho calculadas.

5.8 ANÁLISE DE MORTE CELULAR DAS ESFERAS EM *HANGING DROP* PADRONIZADAS

Com o intuito de observar se o método utilizado para padronização do cultivo das *hanging drops* por si promovia morte celular, tanto as gotas mantidas em *hanging drop* por 72h, como as gotas mantidas durante 72h em gota + 120h em Polyhema, foram submetidas à incubação com Iodeto de Propídeo (PI) (25µg/mL) e fotos representativas foram tiradas em microscópio de fluorescência. Para controle positivo, foi adicionado às amostras 0,1% de Triton-x, com o intuito de permeabilizar a membrana celular e facilitar a entrada do PI.

5.9 ANÁLISE DA PRESENÇA DO MARCADOR CD133 POR MICROSCOPIA CONFOCAL NAS ESFERAS EM *HANGING DROP* E POLYHEMA

A análise da presença do marcador CD133 foi realizada por imunocitoquímica, em microscopia confocal. As esferas foram previamente fixadas com paraformaldeído (PFA) a 4% e lavadas quatro vezes, sendo as duas primeiras com PBS com 0,01% de saponina, a terceira com PBS com 0,01% de saponina e 0,1 M de glicina e a última com PBS com 0,01% de saponina novamente, por 5 minutos a 4°C. Em seguida, foram bloqueadas com 0,5% de BSA em tampão PBS contendo 0,01% de saponina e 2 mM de EDTA e então incubadas com o anticorpo CD133 conjugado com PE (1:10, em tampão de bloqueio) por 3 horas a 4°C, no escuro. Logo após foram realizadas três lavagens, sendo a primeira e a terceira somente com PBS e a segunda com PBS, 1% de BSA e 0,01% de saponina. As esferas foram então incubadas com DAPI 1:1000 por 45 minutos. Depois de lavadas três vezes com PBS, a lâmina histológica foi montada com Fluoromont G.

5.10 PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE CULTIVO DE NEUROESFERAS EM MEIO NSC

Tendo em vista que a forma mais comum de cultivo de neuroesferas na literatura faz uso do meio definido para células tronco neurais (NSC), foram realizados ensaios a fim de validar seu enriquecimento em células tronco, pela presença do marcador CD133, e ainda, observar o comportamento das esferas frente ao tratamento conjunto de TMZ e SVA.

5.11 ANÁLISE DA PRESENÇA DO MARCADOR CD133 POR MICROSCOPIA CONFOCAL NAS ESFERAS EM MEIO NSC

A análise da presença do marcador CD133 foi realizada por imunocitoquímica, em microscopia confocal. As esferas foram previamente fixadas com paraformaldeído (PFA) a 4% e lavadas quatro vezes, sendo as duas primeiras com PBS com 0,01% de saponina, a

terceira com PBS com 0,01% de saponina e 0,1 M de glicina e a última com PBS com 0,01% de saponina novamente, por 5 minutos a 4°C. Em seguida, foram bloqueadas com 0,5% de BSA em tampão PBS contendo 0,01% de saponina e 2 mM de EDTA e então incubadas com o anticorpo CD133 (1:10) conjugado com PE (tampão de bloqueio) por 3 horas a 4°C, no escuro. Logo após foram realizadas três lavagens, sendo a primeira e a terceira somente com PBS e a segunda com PBS, 1% de BSA e 0,01% de saponina. As esferas foram então incubadas com DAPI 1:1000 por 45 minutos. Depois de lavadas três vezes com PBS, a lâmina histológica foi montada com Fluoromont G.

5.12 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE NEUROESFERAS EM MEIO NSC

As células U87MG foram plaqueadas em 5 mL de meio definido NSC em placas de 100mm³ revestidas com polyhema em uma confluência de 1×10^6 células/placa. As placas foram então incubadas durante 4 dias na estufa a 37°C, sob atmosfera contendo 5% de CO₂. Após a incubação e formação das neuroesferas, foram adicionados mais 2mL contendo os tratamentos (DMSO; EtOH; DMSO+EtOH; TMZ 100µM; SVA 1µM; TMZ 100µM + SVA 1µM) às placas. Foi então feita a incubação nas condições já citadas durante 72h. A análise das neuroesferas quanto ao número e tamanho foi realizada através de 4 fotos representativas tiradas de cada condição de tratamento utilizando câmera Zeiss Axio Cam MR.

5.13 ANÁLISE DE MORTE CELULAR POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Para a análise de morte celular após as condições de tratamento foi realizado o ensaio de dupla marcação com Anexina/PI. A anexina é um marcador para detecção de apoptose, pois, uma vez que a célula está em processo de apoptose, ocorre a translocação da fosfatidilserina da região interna para a região externa da membrana plasmática, tornando possível a ligação da anexina e a leitura da fluorescência emitida por um fluoróforo conjugado à ela (FITC). Já o PI (Iodeto de Propídio) é um marcador nuclear fluorescente utilizado para distinguir células com integridade ou não de membrana. O iodeto de propídio é uma molécula que se intercala no DNA, desde que a membrana celular esteja permeável. Sendo assim, as células U87MG foram plaqueadas em placas de 48 wells ($1,8 \times 10^4$ células/well) revestidas com polyhema e incubadas durante 4 dias a fim de permitir a formação das neuroesferas. Após isso, foram submetidas às diferentes condições de tratamento durante 72h. Ainda, foram incluídos os controles positivos do experimento, sendo que para Anexina⁺ foi utilizado o tratamento das células com SVA 5µM e para controle positivo da dupla marcação (Anexina⁺ e PI⁺) foi utilizado o tratamento com Cisplatina na concentração de 10µM. Para o controle positivo da marcação com PI foi adicionado,

juntamente com o tampão de ligação, 0,1% de Triton-X, a fim de permeabilizar a membrana e certificar que o PI entrasse na célula. Depois do tratamento, as esferas foram coletadas, desagregadas e centrifugadas à 1000 rpm durante 1 minuto. Para marcação apenas com Anexina V-FITC, o *pellet* foi ressuspensão em 0,150mL de tampão de ligação (10 mmol/L HEPES, 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L KCl, 1 mmol/L MgCl₂, 1,8 mmol/L CaCl₂, pH 7,4) e 50µL de Anexina V-FITC (diluição 1:19; BD Biosciences) durante 15 minutos. Para a marcação apenas com o PI, o *pellet* de células foi incubado com 0,199mL de tampão de ligação com 0,1% de Triton-X e 1µL de PI (solução estoque de 100µg/mL de PI diluído em água milliQ) durante 15 minutos, sob proteção da luz. E, para as amostras e para a condição do controle de dupla marcação, as células foram incubadas com 0,149mL de tampão de ligação + 1µL de PI + 50µL de Anexina. Após os 15 minutos de incubação, cada amostra foi adicionada em um poço de 48 wells e foram tiradas 3 fotos de cada poço em Microscópio de Fluorescência. A intensidade de fluorescência foi medida através do programa ImageJ.

5.14 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MARCADORES DE CÉLULAS TRONCO TUMORAIS APÓS TERAPIA CONJUNTA DE TMZ + SVA

5.14.1 Extração de RNA Total

As células foram plaqueadas em densidade de 1×10^6 células por placa de 100mm³ revestidas com polyhema em 5mL de meio NSC. Passados 4 dias, foram adicionados 2 mL de meio com tratamento e mantidas por 72h em estufa a 37°C e 5% CO₂. Transcorrido o tempo de tratamento, o meio de cultivo foi coletado de cada placa e colocado em falcons, as esferas decantaram e o sobrenadante foi descartado. O RNA total dos *pellets* foi isolado utilizando o High Pure RNA Isolation Kit (Roche), seguindo as instruções do fabricante. O RNA isolado foi então quantificado no Nanodrop 2000 (Thermo).

5.14.2 Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit ImProm II Reverse Transcriptase (Promega), seguindo as instruções do fabricante.

5.14.3 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR)

A qPCR foi realizada em termociclador Step One Plus (Life Technologies), utilizando o kit SYBR Green Master Mix (Life Technologies), utilizando primers específicos para o transcrito que se desejou quantificar (Life Technologies). As sequências dos *primers* estão descritas na TABELA 1.

TABELA 1 SEQUÊNCIA DOS *PRIMERS* UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS

Gene	Sequência	Concentração
CD133	Forward: AGTCGGAAACTGGCAGATAGC Reverse:GGTAGTGTTGTACTGGGCCAAT	600nM
CD15	Forward: GATCTGCGCGTGTGGACTA Reverse: GAGGGCGACTCGAAGTTCAT	600nM
Sox-2	Forward: TGGACAGTTACGCGCACAT Reverse: CGAGTAGGACATGCTGTAGGT	600nM
HPRT	Forward:GAACGTCTTGCTCGAGATGTGA Reverse:TCCAGCAGGTCAGCAAAGAAT	200nM
HMBS	Forward:TGGACCTGGTTGTTCACTCCTT Reverse:CAACAGCATCATGAGGGTTTTTC	200nM
GAPDH	Forward: ACCCACTCCTCCACCTTTGA Reverse:CTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT	400nM

5.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software, San Diego, CA). Para a comparação entre os valores experimentais obtidos entre o controle e as condições de tratamento, foi realizado o teste ANOVA com teste de Tukey. Valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Os gráficos deste trabalho estão expressos como a média dos experimentos independentes \pm o desvio padrão.

6 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 PADRONIZAÇÃO DO CULTIVO EM *HANGING DROP*

A técnica de *hanging drop* baseia-se no cultivo das células que ficam suspensas em uma tampa de placa de cultura devido à tensão superficial, então a gravidade induz a agregação de células, formando um esferoide. A estratégia de se utilizar gotas em suspensão para a geração de esferoides possui vantagens em relação aos métodos convencionais, como a facilidade de cultivo e baixo custo. Além disso, é possível ter um controle do tamanho das esferas, fazendo com que fiquem homogêneas.

Tendo em vista que trata-se de uma técnica de baixo custo para o cultivo de células em modelo 3D, e que ao utilizar essa metodologia poderíamos favorecer a manutenção de células tronco, por manter um microambiente favorável ao seu crescimento, escolheu-se essa técnica para iniciar a tentativa de enriquecimento em células tronco tumorais. Foi realizada previamente uma padronização do cultivo das células de glioblastoma humano (U87MG) utilizando a técnica de *hanging drop*. Tanto a quantidade de células, variando de 80 a 500 células/gota, quanto o volume de gota (de 20 a 50 μ L), e meio de cultivo (com ou sem HEPES; com ou sem antibióticos e com ou sem soro fetal bovino) e, ainda, condição de hidratação das gotas (com ou sem PBS na base da placa) utilizados foi padronizado durante a realização do trabalho de conclusão de curso (TCC) da aluna Melissa Mara da Silva (SILVA, 2016) (FIGURA 1). Esse trabalho foi realizado sob orientação das Professoras Adriana de Oliveira Christoff (UniBrasil) e Sheila Maria Brochado Winnischofer (UFPR) e minha supervisão.

Foram testadas diferentes quantidades de células para obter o tamanho do esferoide desejado. O plaqueamento de 20, 40, 60 e 80 células resultou na formação de esferas não regulares e não homogêneas, com médias de diâmetro que não alcançaram 150 μ m (figuras não mostradas). Já nos plaqueamentos de 100, 200, 500 e 1000 células/gota (FIGURA 1D, E, F e FIGURA 2C) as esferas apresentaram em média um diâmetro acima de 150 μ m. Com o intuito de facilitar a realização de testes futuros, a condição com 1000 células por gota foi escolhida para ser utilizada no presente trabalho.

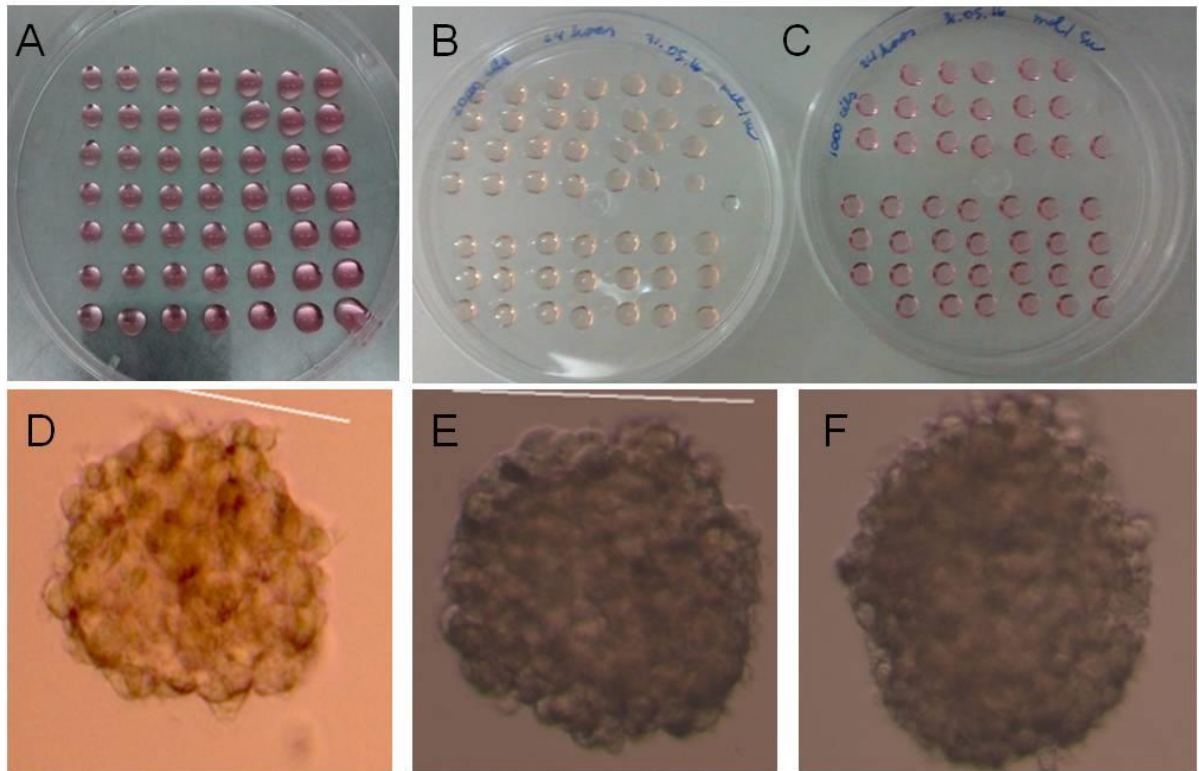


FIGURA 1 PADRONIZAÇÃO DO VOLUME, QUANTIDADE E HIDRATAÇÃO DAS *HANGING DROPS*

No painel A: Fotografia representativa das gotas plaqueadas em diferentes volumes: (Esq. para dir.) 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 μL ; B e C: Fotografias representativas das gotas plaqueadas em diferentes condições de umidade - B com PBS no fundo da placa e no painel C sem PBS. Paineis D-F: Fotografias representativas das esferas formadas a partir do plaqueamento de 100, 200 e 500 células, respectivamente nos painéis D, E e F, cultivadas em *hanging drops* após 72 horas.

Para a definição do tempo em que as células ficariam nas gotas em suspensão, a formação dos esferoides foi analisada em 24, 48 e 72 horas de cultivo. Os agregados a partir do plaqueamento de 1000 células/gota foram gerados nos 3 tempos estabelecidos e podem ser observados na FIGURA 2. Nota-se na FIGURA 2A que no cultivo durante 24h as células não conseguem se agregar de forma a produzir um esferoide. Esse comportamento mantém-se, em parte, no tempo de 48h de cultivo (FIGURA 2B), no qual as células estão agregadas, mas com formatos irregulares. Esse quadro muda no tempo de 72h de cultivo (FIGURA 2C), no qual o agregado formado se mostra parecido a um esferoide. Sendo assim, o tempo de cultivo em *hanging drop* de 72h foi escolhido para seguimento dos experimentos.

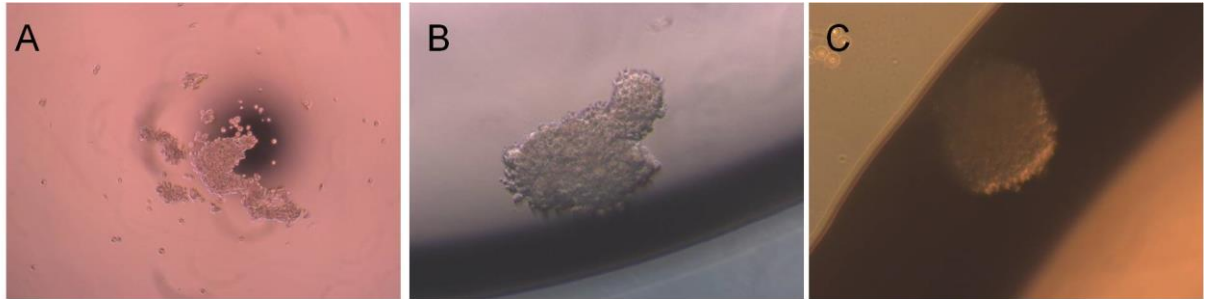


FIGURA 2 MORFOLOGIA DOS AGREGADOS EM DIFERENTES TEMPOS DE CULTIVO EM *HANGING DROP*.

Fotos representativas de 3 experimentos independentes dos agregados formados a partir do plaqueamento de células U87MG na quantidade de 1000 células/gota durante (A) 24h, (B) 48h e (C) 72h. Objetiva 5x – Microscópio Carl Zeiss, modelo Axiovert 40, câmera Zeiss Axio Cam MR.

Além disso, após o tempo de cultivo em gota, o qual promove basicamente a agregação das células em esferas, pensou-se em realocá-las em um ambiente em que não favorecesse a diferenciação e aderência à placa de cultivo, mas que permitisse com que as células tivessem maior interação entre elas e que pudessem então expressar genes relacionados às características de células tronco. Dessa forma, durante a padronização, foi escolhido o melhor substrato não aderente para recobrir as placas de cultivo. Foram testados: ágar (1%), polyhema (1.2%) e polyhema (2.5%). Para isso, células aderentes foram soltas e plaqueadas em densidade de 1×10^6 células em placas de 100mm³. Na condição com ágar 1%, as esferas formadas não eram compactas e possuíam bordas irregulares após 24 e 48 horas de cultivo. Já nas placas recobertas com polyhema, observou-se a formação de esferas nos dois tempos, sendo que na condição do polyhema menos concentrado (1.2%) as esferas geradas apresentavam-se mais uniformes e com bordas mais regulares (FIGURA 3). Dessa forma, o substrato escolhido para colocarmos as esferas após as 72h em *hanging drop* foi o polyhema na concentração de 1.2%.

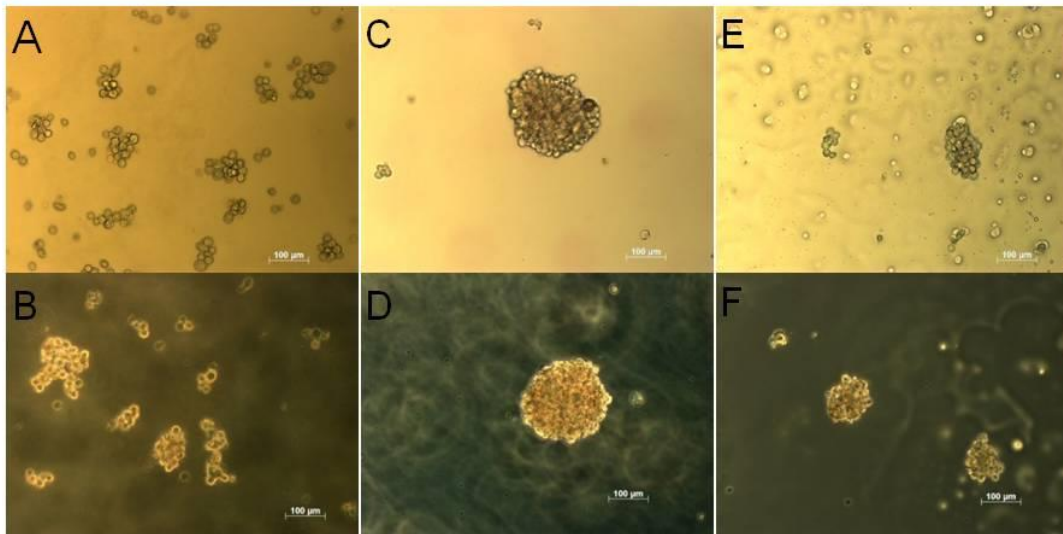


FIGURA 3 TESTE PARA ESCOLHA DO SUBSTRATO NÃO ADERENTE

Nos painéis A e B, células cultivadas em ágar 1%; C e D polyhema 1.2% e E e F polyhema 2.5% durante (A,C e E) 24h e 48h (B, D e F).

6.1.1 Morfologia durante o tempo de cultivo em gota e em substrato não aderente

Determinadas as melhores condições de cultivo para o método de *hanging drop* para a linhagem U87MG pela aluna Melissa Mara da Silva (SILVA, 2016), foram realizados os experimentos seguintes com a quantidade de 1000 células por gota de 25µL, cultivadas em meio DMEM A.G, (+) 10% de SFB, (+) antibióticos, (-) HEPES durante 72h. Para confirmar se a linha do tempo estabelecida era de fato adequada, foi analisada a morfologia das esferas após 3 dias em *hanging drop* e também após 3 dias em *hanging drop* mais 5 dias em Polyhema.

A média do diâmetro das esferas após 72h de cultivo em *hanging drop* foi de 241,5µm, enquanto a média após as 72h em *hanging drop* + 120h no Polyhema 1.2% foi de 344,8µm. Os agregados apresentaram morfologia semelhante a esferas e mostraram-se compactas após agregarem-se. Fotos representativas dessas condições podem ser observadas na FIGURA 4. Verifica-se também que as esferas no tempo final de cultivo, além do aumento no tamanho, apresentaram uma morfologia mais arredondada e compacta e bordas mais regulares quando comparadas às esferas obtidas apenas após o tempo em *hanging drop*.

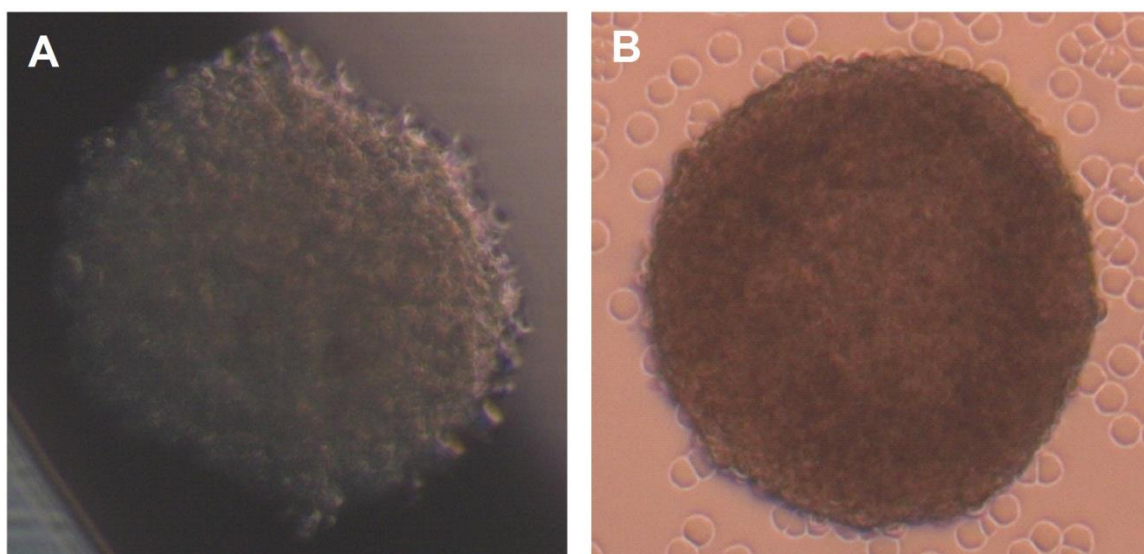


FIGURA 4 MORFOLOGIA DOS ESFEROIDES APÓS TEMPO DE CULTIVO EM *HANGING DROP* E *HANGING DROP* + SUBSTRATO NÃO ADERENTE.

Foto representativa de 3 experimentos independentes dos agregados formados a partir do plaqueamento de células U87MG - 1000 células/gota (A) durante 72h em *hanging drop*. (B) durante 72h em *hanging drop* + 120h em substrato não aderente, polyhema. Objetiva 5x – Microscópio Carl Zeiss, modelo Axiovert 40, câmera Zeiss Axio Cam MR.

Ainda, com o objetivo de observar se as esferas estavam em um tamanho adequado, de forma que todas recebessem os nutrientes necessários, e confirmar que não estavam com o interior do esferoide em necrose, foi realizado um ensaio de morte celular incubando as células com Iodeto de propídeo (PI). O PI é um conhecido intercalante de DNA, entrando apenas nas células já com a membrana comprometida. Células U87MG foram plaqueadas e mantidas em *hanging drop* por 72h e também mantidas na condição onde as esferas formadas por 72h em *hanging drop* foram submetidas a 120h adicionais no meio não-aderente, polyhema. Os resultados podem ser visualizados na FIGURA 5, onde o painel da esquerda representa a visualização das esferas em microscopia de campo claro e o painel da direita representa o canal vermelho, do PI, mantidas nas diferentes condições de tratamento. Pode-se observar na FIGURA 5A, o controle positivo, no qual as esferas foram tratadas com 0,1% de Triton-x, com o intuito de permeabilizar as membranas das células. Já na FIGURA 5B, está representada a esfera que ficou durante 72h em gota e sua marcação com PI. Nota-se que poucas células tiveram seu DNA intercalado pelo marcador, assim como na FIGURA 5C, que representa as esferas que permaneceram 72h em gota e mais 120h no polyhema.

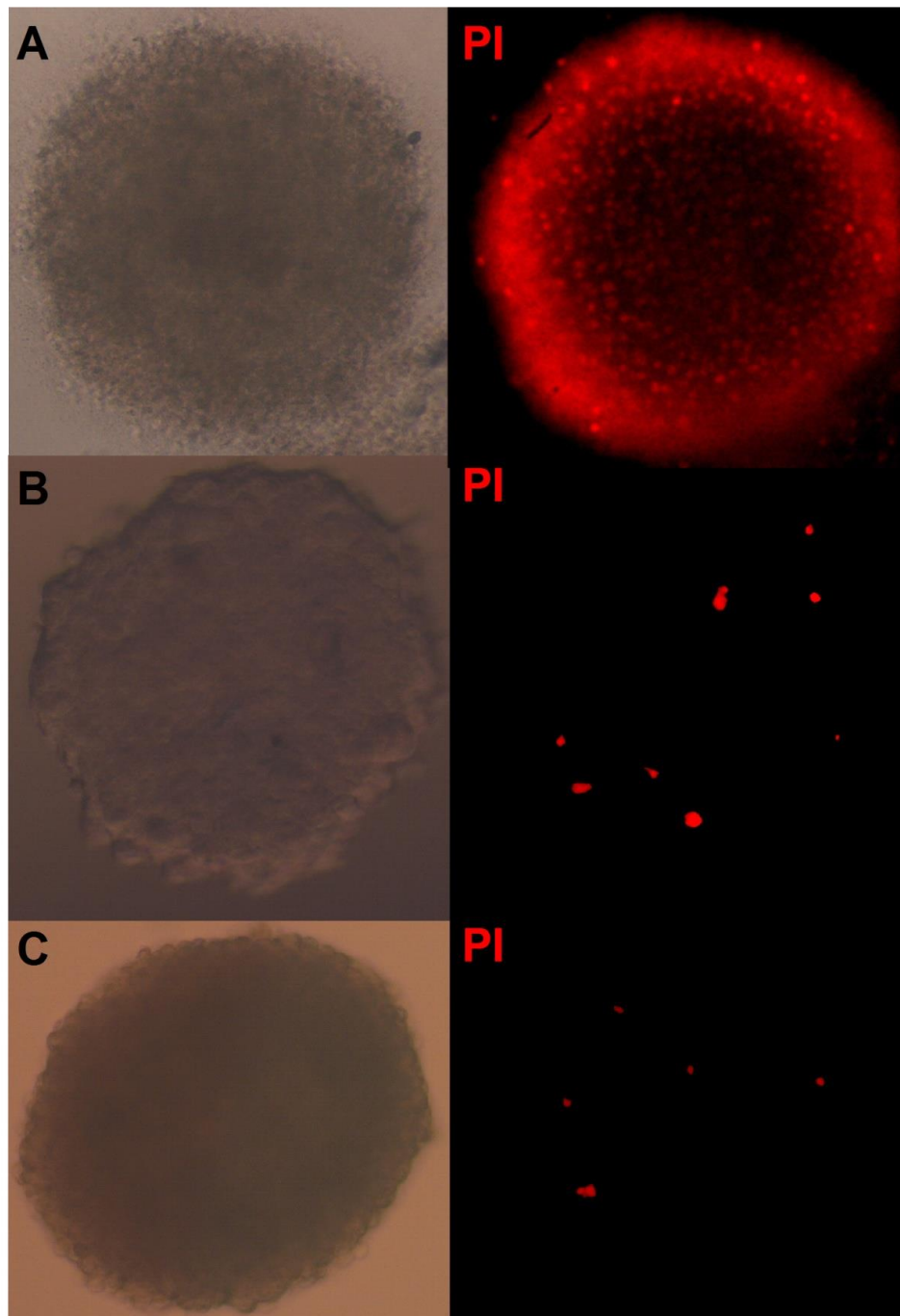


FIGURA 5 ENSAIO DE AVALIAÇÃO DE MORTE CELULAR NAS ESFERAS ESTABELECIDAS DURANTE PROTOCOLO DE CULTIVO EM *HANGING DROP* E *HANGING DROP* SEGUIDO DE CULTIVO EM SUBSTRATO NÃO ADERENTE.

Fotos representativas de 3 experimentos independentes dos agregados formados a partir do plaqueamento de células U87MG - 1000 células/gota. (A) Controle positivo, esferas permeabilizadas com Triton-x e marcadas com PI. (B) Esferas formadas durante 72h em *hanging drop* e marcadas apenas com PI. (C) Esferas mantidas por 72h em *hanging drop* seguido de cultivo em substrato não aderente, polyhema, por 120h e marcadas com PI. Objetiva 5x – Microscópio Carl Zeiss, modelo Axiovert 40, câmera Zeiss Axio Cam MR. PI (25µg/mL).

6.2 ANÁLISE DA PRESENÇA DO MARCADOR CD133 POR MICROSCOPIA CONFOCAL NAS ESFERAS FORMADAS EM *HANGING DROP* E *HANGING DROP* SEGUIDO DE CULTIVO EM SUBSTRATO NÃO ADERENTE

Confirmado que as condições padronizadas formavam esferas com tamanho adequado, bordas regulares, morfologia compacta e sem indícios de morte celular no interior de esferoide, o próximo passo foi analisar se cultivando as células durante 3 dias em gota e mais 5 dias em polyhema haveria enriquecimento em células tronco tumorais. Esse enriquecimento foi analisado a partir da presença do marcador de membrana CD133, através da técnica de microscopia confocal. As gotas foram plaqueadas e, após 72h, os esferóides formados foram fixados com paraformaldeído. Ainda, as esferas formadas após as 72h em gota foram também mantidas por mais 120h no polyhema e então foi realizado o protocolo de fixação. Essas duas condições foram então marcadas com DAPI e com CD133 e fotos representativas foram tiradas. O esquema na FIGURA 6 ilustra como foi feito o cultivo para então ser feita a marcação.

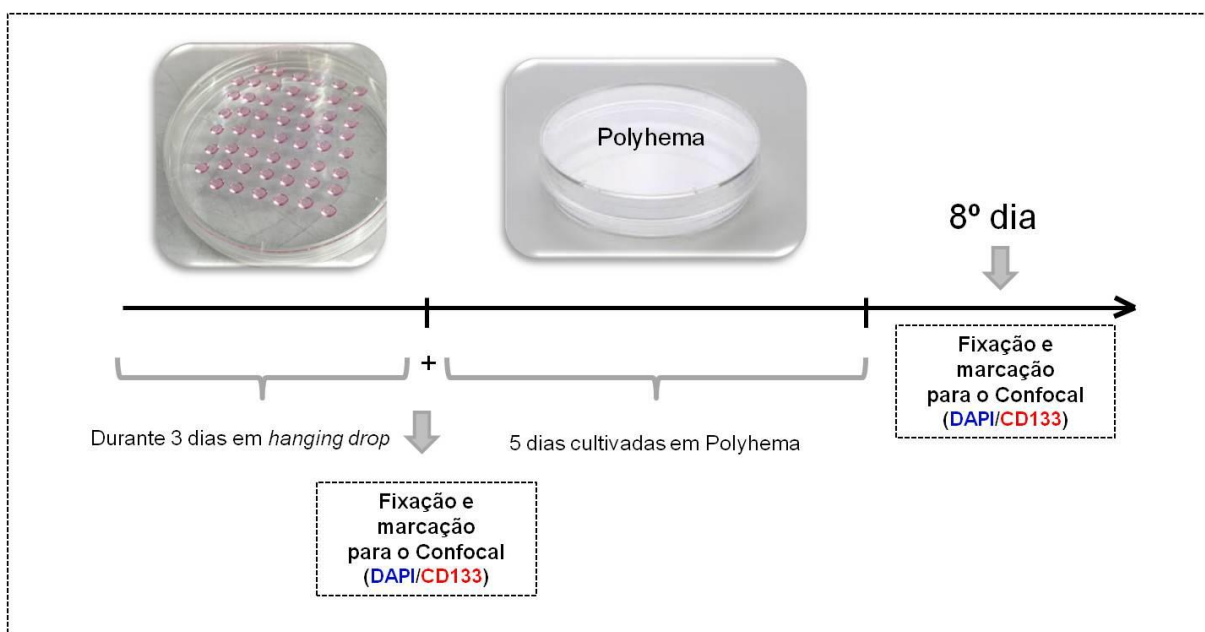


FIGURA 6 ESQUEMA DE CULTIVO PARA MARCAÇÃO DAS ESFERAS COM CD133 POR MICROSCOPIA CONFOCAL.

As fotos obtidas no confocal podem ser observadas na FIGURA 7, na qual a FIGURA 7 A é uma imagem representativa da condição Controle – Branco da marcação com CD133 (onde a esfera não foi incubada com o anticorpo anti-CD133); já a FIGURA 7 B mostra a esfera após 72h de cultivo em *hanging drop* e marcadas com DAPI/CD133 e a FIGURA 7 C mostra a esfera que ficou em cultivo em gota por 72h seguida de cultivo por

120h em polyhema e marcadas com DAPI/CD133. É possível perceber que apenas o cultivo durante 72h em gota não permitiu um enriquecimento e marcação com o CD133 (FIGURA 7B). Porém, esse perfil muda ao cultivar as esferas por mais 120h em polyhema, fazendo com que a marcação aparecesse através da fluorescência emitida em vermelho (FIGURA 7C). Sendo assim, confirmou-se que o cultivo da linhagem U87MG seguindo metodologia de *hanging drop* trouxe, de fato, um enriquecimento na subpopulação de células tronco tumorais.

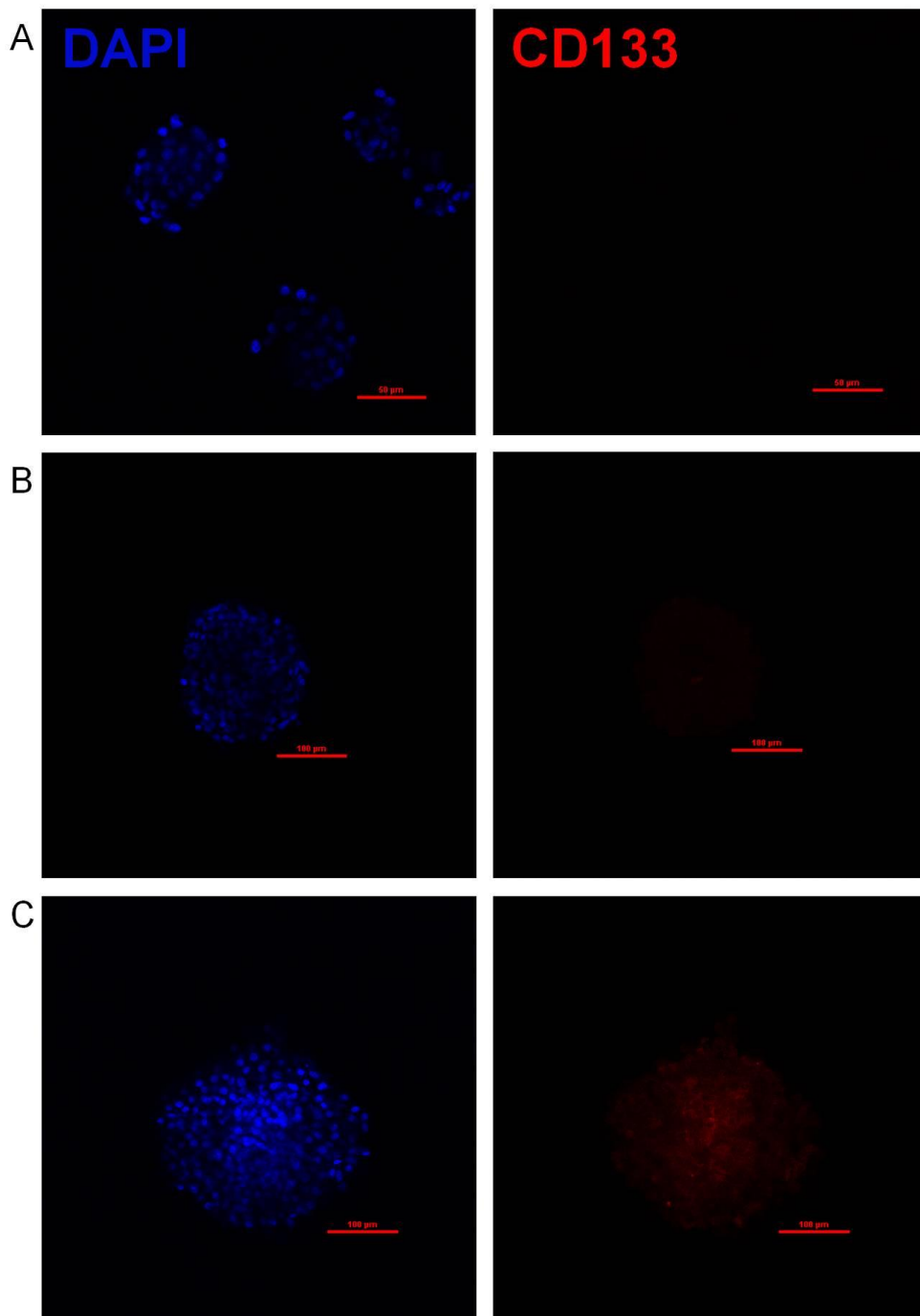


FIGURA 7 ANÁLISE DA PRESENÇA DO MARCADOR CD133 NAS ESFERAS OBTIDAS PELO PLAQUEAMENTO EM *HANGING DROP* E EM *HANGING DROP* SEGUIDO DE CULTIVO EM SUBSTRATO NÃO ADERENTE, POLYHEMA.

Células U87MG foram plaqueadas em *hanging drop* durante 72h e em *hanging drop* seguido de cultivo em substrato não aderente, polyhema, por mais 120h, e seguiu-se análise por microscopia confocal. O painel A mostra as esferas da condição branco, na qual as esferas obtidas não foram incubadas com o anticorpo CD133, nos canais de fluorescência do DAPI (painel esquerdo) e CD133 (painel direito). Já o painel B mostra as esferas mantidas por 72h em *hanging drop* marcadas com DAPI e CD133. Enquanto o painel C representa as esferas mantidas por 72h em *hanging drop* seguidas de cultivo por 120h no polyhema e então marcadas com DAPI e CD133. Imagens representativas de 3 esferas obtidas de 1 experimento independente. Objetiva 20x – Microscópio Confocal Nikon; Diluição utilizada: CD133 1:10; DAPI 1:1000.

6.3 ANÁLISE DA PRESENÇA DO MARCADOR CD133 POR PCR EM TEMPO REAL NAS ESFERAS EM *HANGING DROP* E EM *HANGING DROP* SEGUIDO DE CULTIVO EM POLYHEMA

Com o intuito de confirmar o resultado de enriquecimento em células tronco tumorais pelo marcador CD133 obtido através da microscopia confocal, foi realizada a análise da expressão gênica, no nível de mRNA, de genes relacionados à manutenção de células tronco neurais, nomeadamente CD133, CD15 e SOX-2. Os resultados estão ilustrados no GRÁFICO 1. As células U87MG foram plaqueadas em meio DMEM 10%SFB em substrato não aderente, polyhema, e mantidas por 96h, observa-se que essa condição (colunas pretas do GRÁFICO 1) não permitiu a expressão do gene CD133, e apresentou uma menor expressão dos genes CD15 e Sox-2, quando comparada à condição das células mantidas por 72h em *hanging drop* (colunas cinza claro do GRÁFICO 1). Já quando as células, além das 72h em *hanging drop* foram mantidas por mais 120h em substrato não aderente (colunas cinza escuro do GRÁFICO 1) mostrou-se um aumento de aproximadamente 2 vezes na expressão de CD133 e CD15 e de 4 vezes na expressão de Sox-2 quando comparada com a condição de células mantidas apenas 72h em *hanging drop*. Dessa forma, permitiu-se corroborar o resultado positivo da microscopia confocal do marcador CD133 nas esferas mantidas em *hanging drop* por 72h seguido de cultivo por 120h em substrato não aderente, polyhema (condição nomeada *hanging drop*/polyhema), e ainda observar o aumento de outros marcadores que podem estar auxiliando no cultivo e manutenção dessa subpopulação de células.

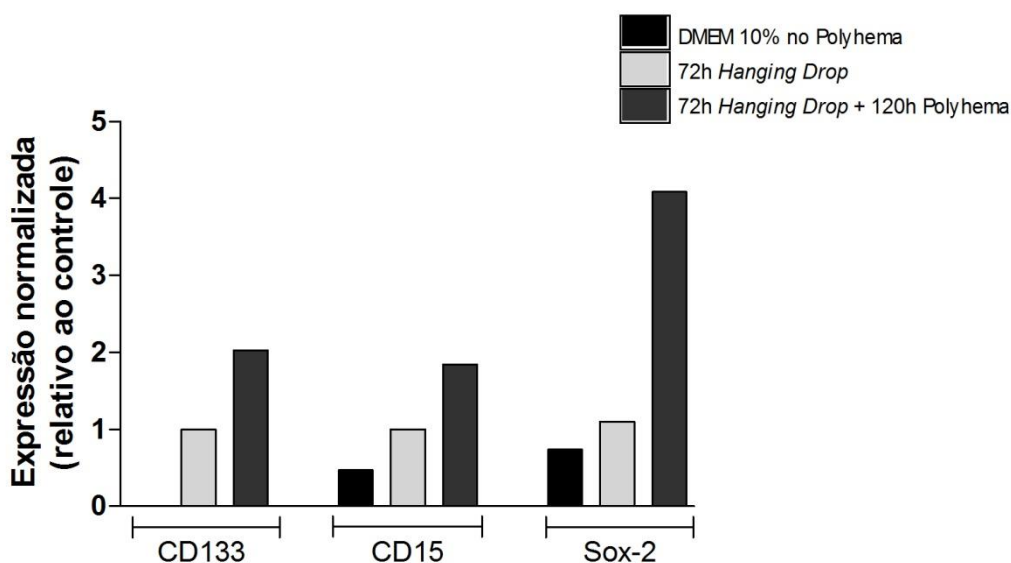


GRÁFICO 1 MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES CD133, CD15 E SOX-2 APÓS PADRONIZAÇÃO DO CULTIVO EM *HANGING DROP* E EM *HANGING DROP* SEGUIDO DE CULTIVO EM SUBSTRATO NÃO ADERENTE

Células U87MG foram plaqueadas (1000 células/gota) e mantidas durante 96h em meio DMEM 10% SFB em polyhema; em 72h em *hanging drop* e ainda por 72h em *hanging drop*, seguido de cultivo em substrato não aderente, polyhema, por mais 120h. O RNA foi então extraído dessas 3 condições, o cDNA sintetizado e as reações de q-PCR realizadas com os primers dos genes CD133, CD15 e Sox-2. O resultado representa 1 experimento e os gráficos são demonstrados como expressão relativa de cada um dos genes de interesse frente à expressão dos genes de controle interno (hGAPDH, hHPRT e hHMBS).

6.4 ANÁLISE DO EFEITO DO TRATAMENTO DE TMZ E SVA NA FORMAÇÃO DAS ESFERAS EM *HANGING DROP*/POLYHEMA

Após a padronização da metodologia por *hanging drop* e substrato não aderente ser realizada, a condição de plaqueamento de 1000 células U87MG, mantidas por 3 dias em gota e subsequentes 5 dias em substrato polyhema 1.2% foi escolhida como a melhor condição para permitir a formação de esferas com enriquecimento em células tronco. Sendo assim o próximo passo foi investigar se o tratamento combinado de TMZ+SVA teria algum efeito citotóxico nessas esferas enriquecidas. Para cumprir esse objetivo, foi realizado o tratamento por 72h adicionais dessas esferas formadas, ainda em substrato não aderente, nas seguintes condições: Controle (DMSO+EtOH), TMZ (100µM), SVA (1µM) e TMZ (100µM) + SVA (1µM). Passado o tempo de tratamento com os fármacos, as médias de diâmetro das esferas foram medidas e contrastadas com a média de tamanho das esferas na condição controle. As médias foram então plotadas em um gráfico (**Erro! Fonte de referência não encontrada.** GRÁFICO 2).

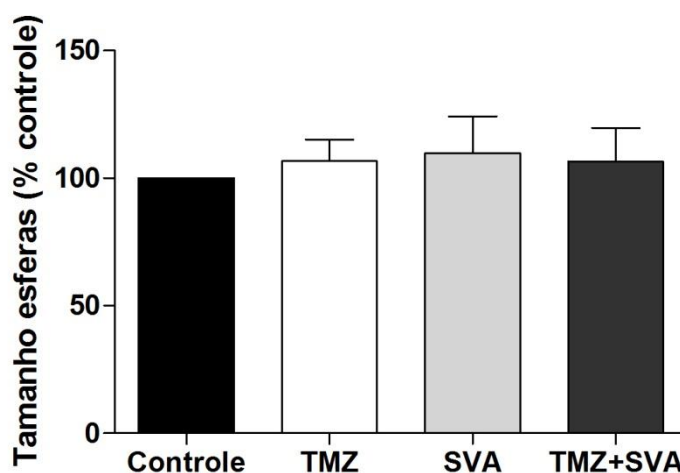


GRÁFICO 2 EFEITO DO TRATAMENTO COM TMZ E SVA NO CRESCIMENTO DAS ESFERAS OBTIDAS APÓS METODOLOGIA *HANGING DROP*/POLYHEMA

As esferas formadas após 3 dias em *hanging drop* e 5 dias em polyhema, foram tratadas por mais 72h com as condições controle (DMSO+EtOH), TMZ (100µM), SVA (1µM) e TMZ (100µM) + SVA (1µM). O tamanho das esferas foi medido após o tempo de tratamento. As médias dos tamanhos foram plotadas no gráfico e as condições tratadas foram comparadas à condição controle. Experimento realizado em triplicatas, contadas 10 esferas por condição.

Percebe-se que o tratamento com os fármacos não foi capaz de alterar o tamanho das esferas já formadas quando comparadas ao controle (DMSO+EtOH). No entanto, houve alterações na morfologia das esferas após o tratamento com as determinadas condições, o que pode ser observado na FIGURA 8. O painel A representa o controle, enquanto os painéis B, C e D mostram esferas representativas das condições TMZ, SVA e TMZ+SVA, respectivamente. Percebe-se que as esferas obtidas na condição controle apresentam morfologia bem arredondada e com bordas bem definidas (FIGURA 8A). As esferas obtidas após o tratamento com TMZ apresentam morfologia semelhante ao controle (FIGURA 8B), mantendo uma borda bem delimitada e regular. Já quando as esferas foram tratadas com a SVA ou TMZ+SVA (FIGURA 8C e 8D, respectivamente), pode-se notar uma alteração nas bordas das esferas, apresentando células mais individualizadas e com aparência menos compactada.

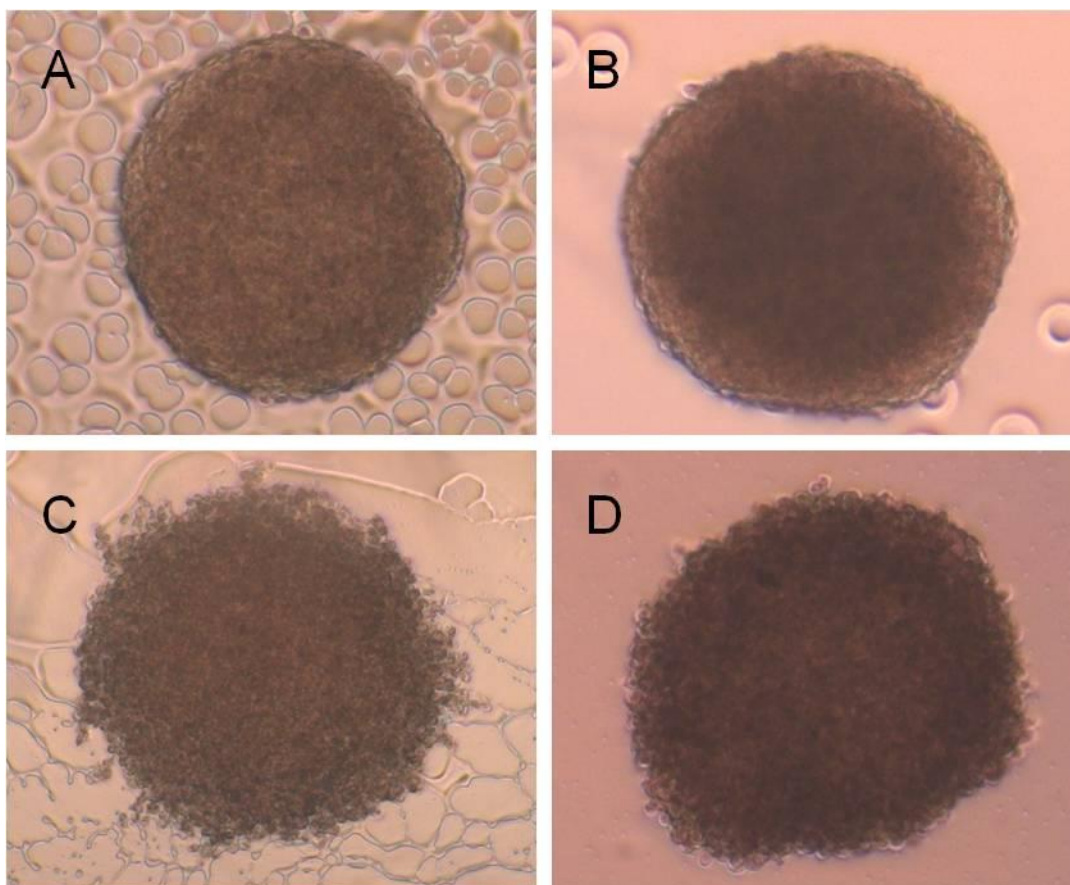


FIGURA 8 EFEITO DO TRATAMENTO COM TMZ e SVA NA MORFOLOGIA DAS ESFERAS OBTIDAS APÓS METODOLOGIA *HANGING DROP*/POLYHEMA

Morfologia das esferas obtidas após 3 dias em *hanging drop* + 5 dias em polyhema + 72h com as condições de tratamento. O painel A representa o controle (DMSO+EtOH), enquanto os paines B, C e D mostram esferas representativas das condições TMZ (100µM), SVA (1µM) e TMZ (100µM) + SVA (1µM), respectivamente. Objetiva 5x – Microscópio Carl Zeiss, modelo Axiovert 40, câmera Zeiss Axio Cam MR. Fotos representativas de 3 experimentos realizados, contadas 5 esferas por condição experimental.

6.5 ANÁLISE DO EFEITO DO TRATAMENTO COM TMZ E SVA DURANTE A FORMAÇÃO DAS ESFERAS EM *HANGING DROP*

Com o intuito de verificar se o tratamento apresentava alguma influência na formação das esferas em *hanging drops*, foi realizado o plaqueamento das gotas com 1000 células U87MG já com os determinados tratamentos diluídos no meio de cultivo. Os resultados podem ser observados na FIGURA 9, nos painéis que vão de A a D.

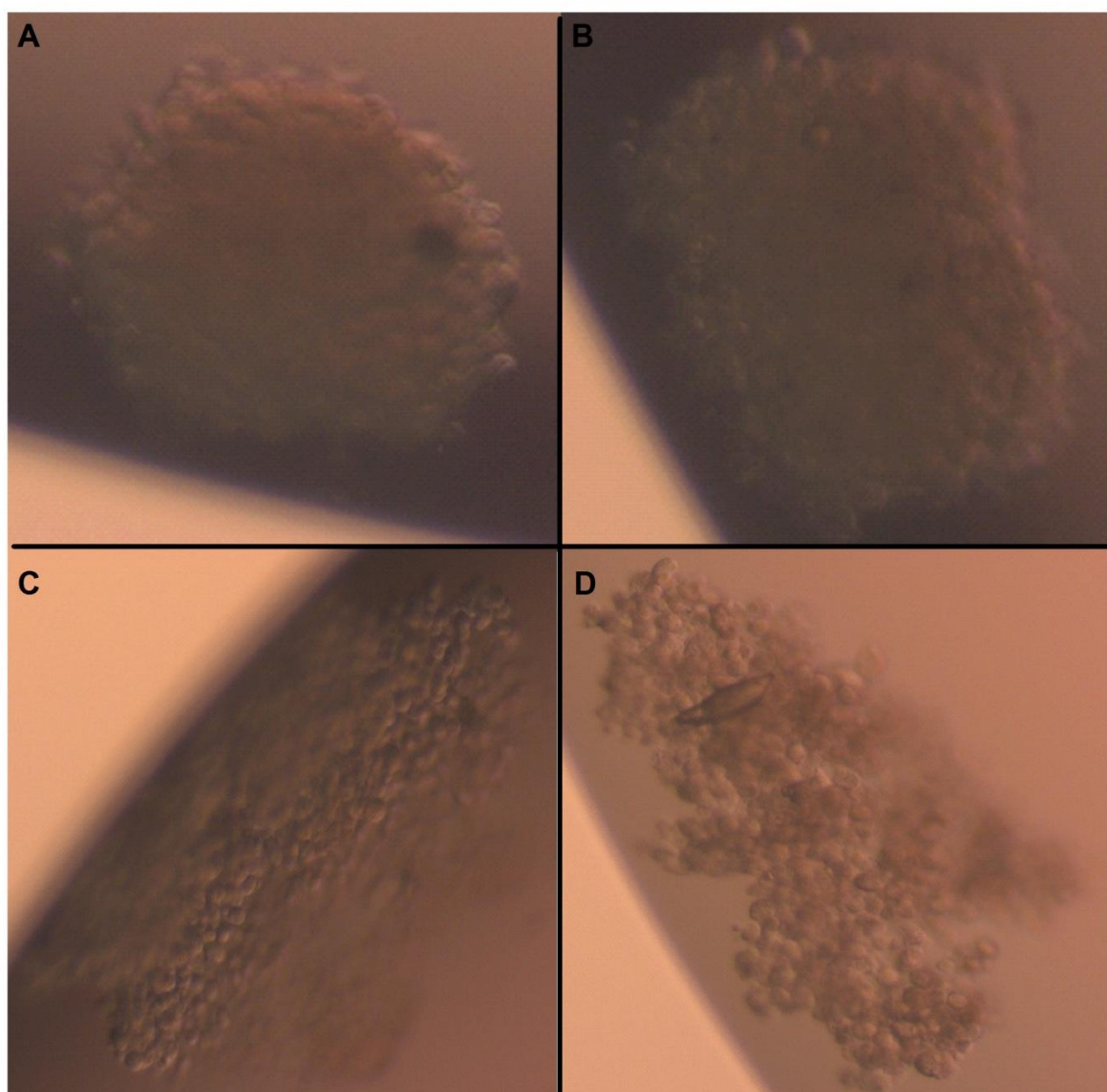


FIGURA 9 EFEITO DO TRATAMENTO COM TMZ E SVA NA MORFOLOGIA DAS ESFERAS EM FORMAÇÃO POR METODOLOGIA *HANGING DROP*

Células U87MG (1000células/gota) foram plaqueadas já com as condições de tratamento e mantidas por 72h em *hanging drop*. (A) controle (DMSO+EtOH), (B) TMZ (100µM), (C) SVA (1µM) e (D) TMZ (100µM) + SVA (1µM). Objetiva 5x – Microscópio Carl Zeiss, modelo Axiovert 40, câmera Zeiss Axio Cam MR. Fotos representativas de 3 experimentos realizados, contadas 5 esferas por condição experimental.

Os agregados celulares formados a partir do plaqueamento em meio de cultura na condição controle (DMSO+EtOH) (FIGURA 9A) não apresentaram mudanças na morfologia quando comparadas aos agregados celulares formados com apenas meio de cultivo (FIGURA 4A), assim como os agregados celulares gerados a partir do meio contendo TMZ (FIGURA 9B). A TMZ parece não alterar as interações entre as células, permitindo que o agregado celular na gota se forme de maneira semelhante ao controle, com bordas

regulares e formato bem delimitado e circular. Já as condições de tratamento com a SVA isolada (FIGURA 9C) e com a combinação dela com a TMZ (FIGURA 9D) promoveram a formação de agregados celulares com morfologias bem diferentes do controle. Os agregados celulares formados a partir do plaqueamento em meio contendo SVA e/ou TMZ+SVA não apresentaram formato de esferoide e as células pareceram mais individualizadas e com menos interações e adesão entre elas. Esse efeito pode ser observado também através da medida do comprimento dos agregados formados, como mostra o GRÁFICO 3. No gráfico é demonstrado um aumento no tamanho dos agregados celulares formados em torno de 215% e 176,5% nas condições SVA e TMZ+SVA, respectivamente, evidenciando perda de interações célula-célula.

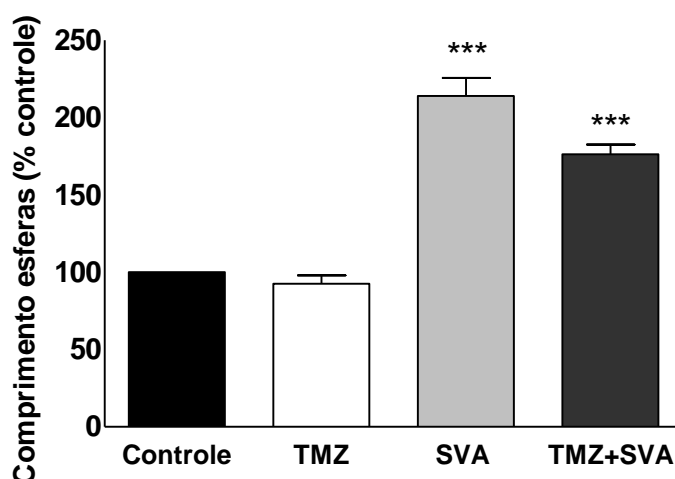


GRÁFICO 3 EFEITO DO TRATAMENTO COM TMZ E SVA NO TAMANHO DOS AGREGADOS CELULARES OBTIDOS DURANTE A FORMAÇÃO DE ESFERAS EM METODOLOGIA *HANGING DROP*

Os agregados formados a partir do plaqueamento de 1000 células por gota com meio contendo os seguintes tratamentos: controle (DMSO+EtOH), TMZ (100µM), SVA (1µM) e TMZ (100µM) + SVA (1µM), durante 72h, tiveram seu comprimento medido e as médias foram plotadas no gráfico, em % em relação ao controle. Objetiva 5x – Microscópio Carl Zeiss, modelo Axiovert 40, câmera Zeiss Axio Cam MR. Fotos representativas de 3 experimentos realizados, contadas 5 esferas por condição experimental.

6.6 PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE CULTIVO DE NEUROESFERAS EM MEIO NSC

Atualmente na literatura, a forma mais utilizada para enriquecimento em células tronco tumorais de glioblastoma se faz através do uso de um meio de cultivo definido, isto é, um meio de cultivo DMEM/F12 suplementado com determinados fatores de crescimento, nomeadamente: EGF, FGF e B27. Esse meio já é utilizado para cultivo de células tronco

neurais normais e favorece a manutenção das características de células tronco *in vitro*. Por isso, no presente trabalho, com o intuito de enriquecimento em células tronco, foi realizado o cultivo das células com esse meio definido mantido em substrato não aderente (polyhema) e então feito o tratamento e os demais experimentos.

6.6.1 Análise da formação de esferas em meio NSC

Primeiramente, observou-se o comportamento de formação de esferas das células U87MG cultivadas no meio NSC. Foram plaqueadas 1×10^6 células por placa de 100mm^3 e mantidas na estufa a 37°C , 5% de CO_2 durante 24, 48, 72 e 96h. Fotos representativas foram tiradas de todos os tempos de cultivo e podem ser visualizadas na FIGURA 10. É possível perceber que o cultivo das células por apenas 24h não permitiu a formação de esferas (FIGURA 10A), porém, nota-se um comportamento de início de agregação das células. Já no tempo de 48h (FIGURA 10B) podem-se notar aglomerados celulares com formatos de esferoides, no entanto, ainda de tamanhos diversos e bordas não tão regulares. Esse comportamento é alterado quando o cultivo é mantido por mais tempo, totalizando 72h e 96h, mostrados nos painéis C e D da FIGURA 10, respectivamente. Nessas condições com maior tempo de cultivo, as esferas formadas apresentaram tamanhos mais similares e bordas mais regulares. Dentre eles, o tempo de 96h de cultivo foi escolhido como o mais adequado para ser usado, uma vez que apresentou esferas de tamanhos mais homogêneos.

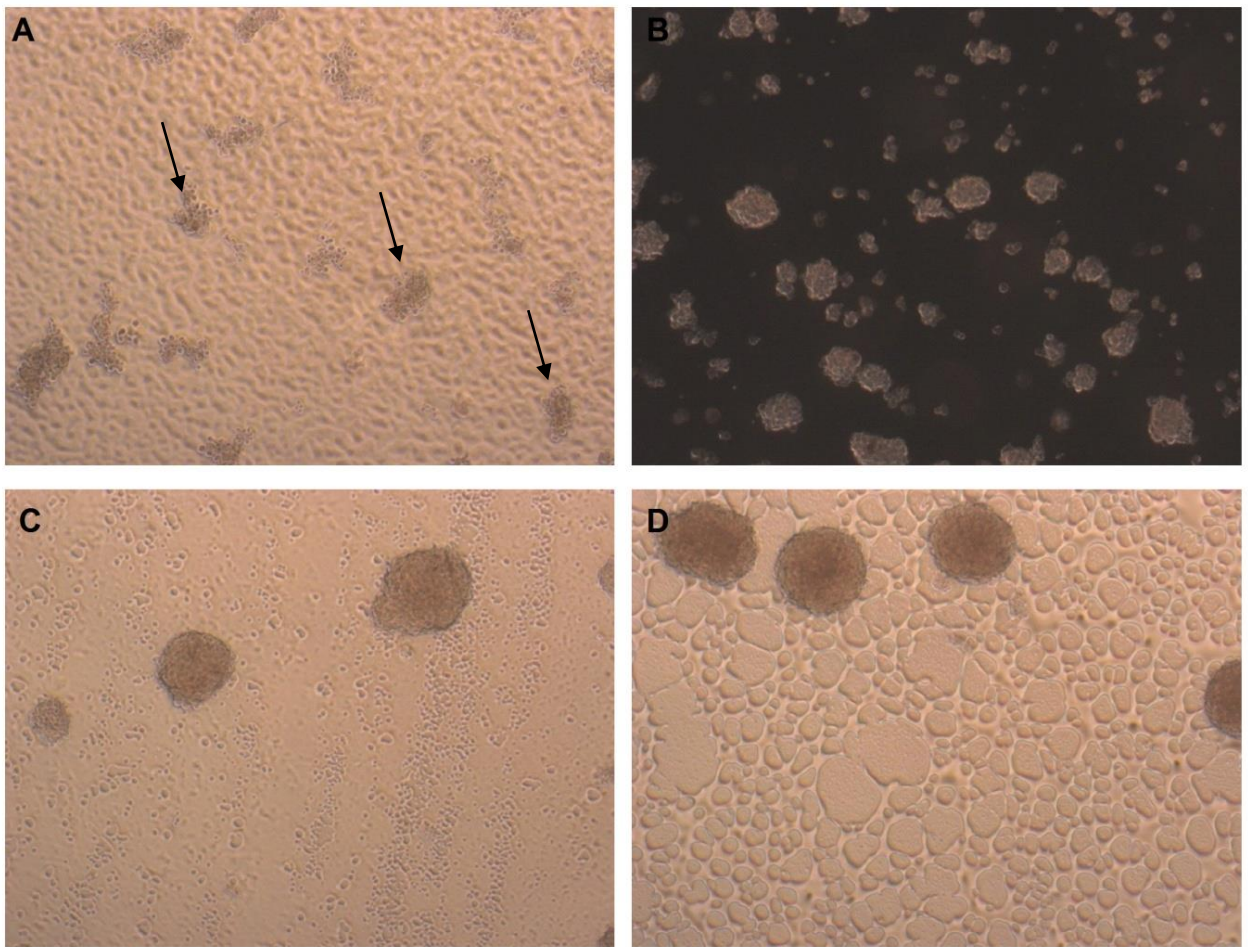


FIGURA 10 MORFOLOGIA DOS AGREGADOS CELULARES FORMADOS EM MEIO NSC Células U87MG (1×10^6 células) foram plaqueadas em placas de 100mm³ em meio NSC e mantidas na estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 24h (A), 48h (B), 72h (C) e 96h (D). Objetiva 5x – Microscópio Carl Zeiss, modelo Axiovert 40, câmera Zeiss Axio Cam MR. Fotos representativas de 2 experimentos independentes.

6.6.2 Análise da presença do marcador CD133 por Microscopia Confocal nas esferas formadas em meio NSC

Com a finalidade de validar o enriquecimento em células tronco relatado na literatura com o uso desse meio, foi feita uma marcação para a proteína CD133 por microscopia confocal nas esferas formadas através do cultivo durante 4 dias em meio NSC e em substrato não aderente (polyhema). Observa-se na FIGURA 11 a marcação das esferas com DAPI e com CD133. Quando comparado à condição controle - o branco (FIGURA 11A), a marcação do anticorpo anti-CD133 se vê pronunciada nas esferas cultivadas por 4 dias no meio NSC (FIGURA 11B), confirmando a presença do marcador nessas esferas, e por consequência o enriquecimento da subpopulação de células tronco.

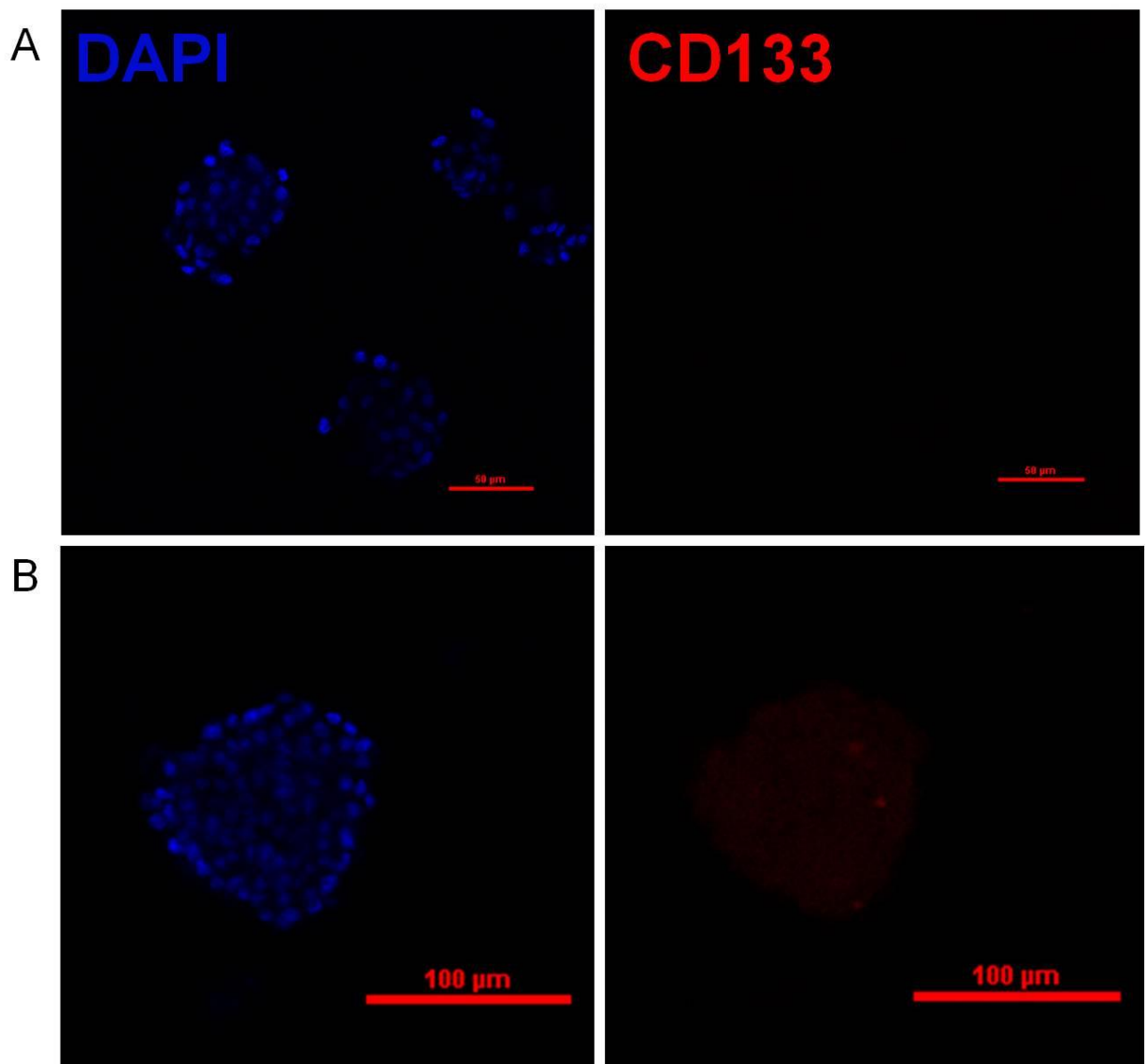


FIGURA 11 ANÁLISE DA PRESENÇA DO MARCADOR CD133 NAS ESFERAS FORMADAS EM MEIO NSC

Células U87MG foram cultivadas em meio NSC por 96h. Na sequência, as células foram fixadas, incubadas com anti-CD133 e a expressão avaliada por microscopia confocal. O painel A mostra as esferas da condição branco, na qual não foi incubado o anticorpo CD133, nos canais de fluorescência do DAPI (painel esquerdo) e CD133 (painel direito). Já o painel B mostra esferas mantidas por 96h em meio NSC marcadas com DAPI (1:1000) e CD133 (1:10). Imagens representativas de 1 experimento, avaliadas 3 esferas por condição. Objetiva 20x – Microscópio Confocal Nikon.

6.6.3 Efeito do tratamento com TMZ e SVA em neuroesferas formadas em meio NSC

Tendo em vista que houve formação de neuroesferas regulares e homogêneas das células U87MG quando cultivadas durante 4 dias em meio definido NSC, e que essas estavam enriquecidas em células CD133⁺, um clássico marcador de células tronco tumorais, o próximo passo foi avaliar o efeito do tratamento com TMZ e SVA nas esferas previamente

formadas. Foram realizadas as seguintes condições experimentais: esferas derivadas de células U87MG controle (mantidas na presença dos veículos: DMSO+EtOH) e esferas tratadas por um período de 72h com TMZ, SVA e a combinação TMZ+SVA. Após o período de tratamento, foi realizada a análise do número e tamanho de neuroesferas obtidas através de fotos representativas tiradas de cada condição de tratamento. Quando as esferas foram tratadas na condição controle (DMSO+EtOH) (FIGURA 12A) não houve alteração na formação das esferas, ficando com morfologia semelhante às esferas da condição só com meio de cultivo durante 96h (FIGURA 10D). O tratamento com a TMZ isolada não trouxe efeitos significativos em relação à morfologia (FIGURA 12B), ao número e tamanho das esferas obtidas (GRÁFICO 4). Por outro lado, nota-se que o tratamento das esferas com SVA isolada e com a combinação (TMZ+SVA) apresentou uma morfologia distinta do controle, e significativa diminuição no número e tamanho das esferas, diminuindo o número de esferas para 57,7% e 40,3%, respectivamente, em relação ao controle (DMSO+Etanol) (GRÁFICO 4A). Esse mesmo padrão de comportamento foi encontrado quanto ao diâmetro dessas esferas após o tratamento (GRÁFICO 4B). A média do diâmetro passou de 155,4 μ m na condição controle, para 81,3 μ m e 83,9 μ m nas condições de SVA e SVA+TMZ, respectivamente. O resultado da ação da SVA e TMZ+SVA pode ser corroborado com as imagens representadas nas FIGURAS 12C e FIGURA 12D. Apesar da TMZ quando isolada não apresentar diminuições estatísticas frente ao número e tamanho das esferas, percebe-se que, quando combinada com a SVA, ocasionou uma tendência maior à diminuição do número de esferas quando comparada à SVA isolada.

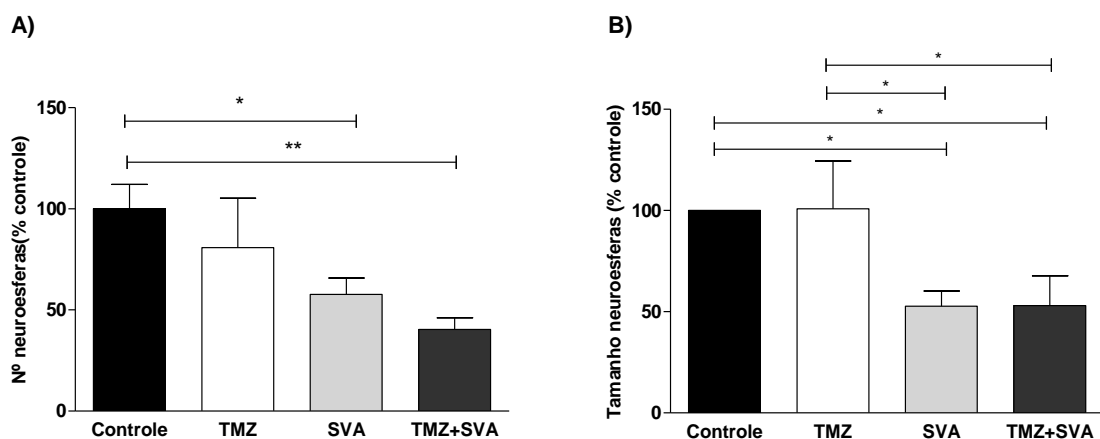


GRÁFICO 4 EFEITO DO TRATAMENTO COM TMZ E SVA NAS NEUROESFERAS FORMADAS EM NSC

Esferas derivadas de células U87MG obtidas a partir do cultivo em meio NSC foram mantidas em diferentes condições experimentais por 72h: controle (DMSO+Etanol), TMZ (100 μ M), SVA (1 μ M) e TMZ (100 μ M)+ SVA (1 μ M). Fotos representativas de 4 campos de 2 experimentos independentes foram tiradas das condições controle e de tratamento. As esferas foram contabilizadas e seus tamanhos foram medidos. A média do (A) número das neuroesferas e do (B) tamanho das neuroesferas após o tratamento de 72h foi plotada nos gráficos acima.

Esse resultado pode ser melhor visualizado através das imagens representativas dos tratamentos mostradas nas FIGURA 12A-D.

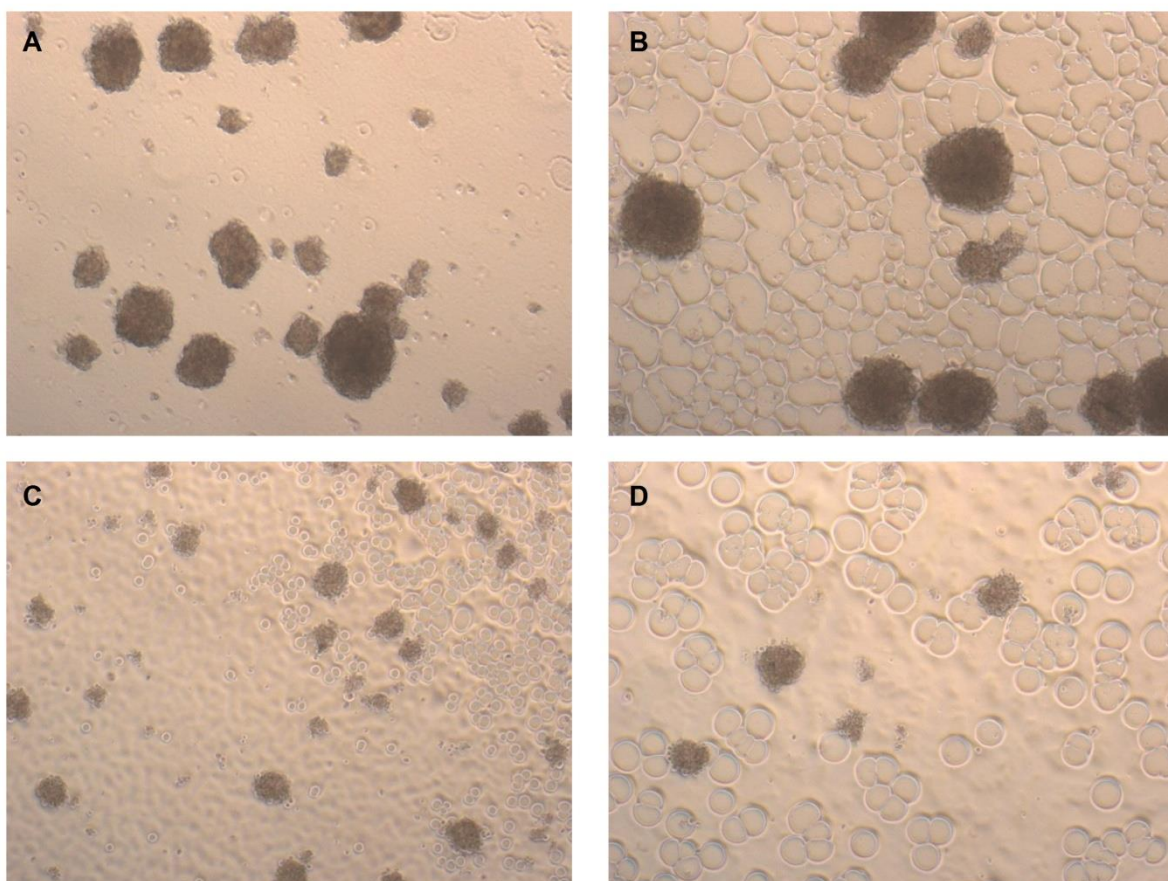


FIGURA 12 EFEITO DO TRATAMENTO COM TMZ E SVA NA MORFOLOGIA DAS ESFERAS EM MEIO NSC

As células U87MG foram mantidas por 96h em meio NSC e depois de formadas as esferas, foram tratadas por mais 72h com as condições de tratamento: (A) Controle (DMSO+EtOH), (B) TMZ (100 μ M), (C) SVA(1 μ M), (D) TMZ (100 μ M) + SVA (1 μ M). Imagens representativas de 2 experimentos independentes foram tiradas. Objetiva 5x – Microscópio Carl Zeiss, modelo Axiovert 40, câmera Zeiss Axio Cam MR.

6.6.4 Análise de morte celular por microscopia de fluorescência das esferas em meio NSC

Sabendo que o tratamento com TMZ e SVA é capaz de diminuir o número e diâmetro das esferas formadas em meio NSC, o passo seguinte foi avaliar se a citotoxicidade observada era decorrente de mecanismos de morte celular, e definir qual tipo de morte celular. Sendo assim, foi realizado o ensaio de dupla marcação com Anexina/PI nas esferas obtidas nas diferentes condições experimentais. Uma vez que a anexina é capaz de fazer o reconhecimento da fosfatidilserina, e sua marcação é um indicativo do processo de morte programada, apoptose, na qual ocorre a translocação da fosfatidilserina da região interna para a região externa da membrana plasmática, torna-se possível a ligação da anexina à fosfatidilserina externalizada e a leitura da fluorescência emitida por um fluoróforo conjugado à anexina (FITC). E o PI (Iodeto de Propídio) é um marcador nuclear fluorescente o qual permite distinguir células com a membrana permeabilizada de células com integridade da membrana. O PI se intercala no DNA, desde que a membrana celular esteja permeável.

As células foram então plaqueadas em meio definido durante 96h, depois disso mantidas nas condições de tratamento. Terminadas as 72h de tratamento, as esferas foram dissociadas e marcadas com anexina e PI, e levadas ao microscópio de fluorescência. O resultado desse ensaio pode ser observado em imagens na FIGURA 13 e, em formato de gráficos (GRÁFICO 5). Na FIGURA 13 estão mostradas as figuras representativas das condições de tratamento para a marcação com anexina e PI. O painel da esquerda representa a visualização das células em microscopia de campo claro, o painel do meio representa o canal verde, da anexina, nas diferentes condições e o painel da direita representa o canal vermelho, do PI, também nas diferentes condições de tratamento. Já a representação em gráfico (GRÁFICO 5A) mostra a representação da marcação de anexina, em percentagem em relação ao controle (DMSO+ EtOH) e a representação da marcação com PI (GRÁFICO 5B). Observa-se um aumento significativo da marcação de anexina, em relação ao controle, tanto na condição com TMZ (529,8%), quanto nas condições de SVA (626,5%) e TMZ+SVA (769,2%), porém, a tendência de aumento gerado pela combinação se mostra maior que o das condições de tratamento isoladas. O aumento de marcação com a anexina, também foi acompanhando de um aumento da marcação com PI, que ocorreu de forma significativa em todas as condições de tratamento, sendo o aumento gerado pela TMZ de 490,3%, pela SVA de 833% e pela combinação de 1029,8%. Percebe-se, ainda, que houve diferença estatística na marcação para PI entre o aumento promovido pela TMZ quando comparado à combinação de TMZ e SVA, demonstrando a vantagem da terapia conjunta em comparação ao quimioterápico utilizado atualmente de forma isolada.

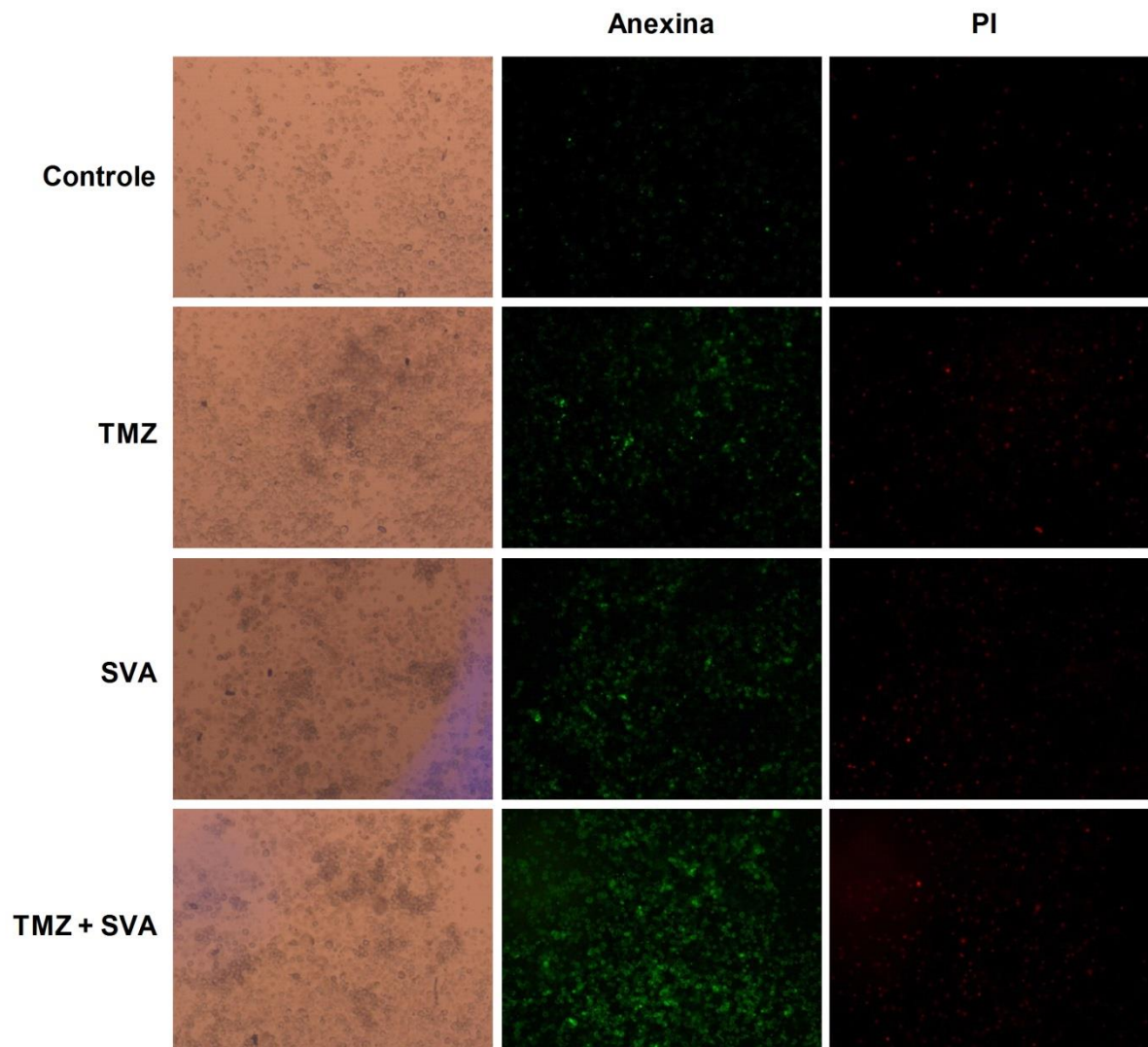


FIGURA 13 ANÁLISE DA DUPLA MARCAÇÃO DE ANEXINA E PI POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DAS ESFERAS CULTIVADAS EM MEIO NSC

As células U87MG foram plaqueadas em meio NSC e mantidas por 96h até a formação de esferas. Foram então tratadas por mais 72h com as condições controle (DMSO+EtOH), TMZ (100 μ M), SVA (1 μ M) e TMZ (100 μ M) + SVA (1 μ M). Após esse tempo, as esferas foram dissociadas e marcadas com anexina e PI. Painel esquerdo: visualização das células sem fluorescência. Painel central: marcação de anexina, em verde. Painel da direita: marcação com PI, em vermelho. Fotos de 2 experimentos independentes de todas as condições foram então tiradas no microscópio de fluorescência. Objetiva 10x – Microscópio Carl Zeiss, modelo Axiovert 40, câmera Zeiss Axio Cam MR.

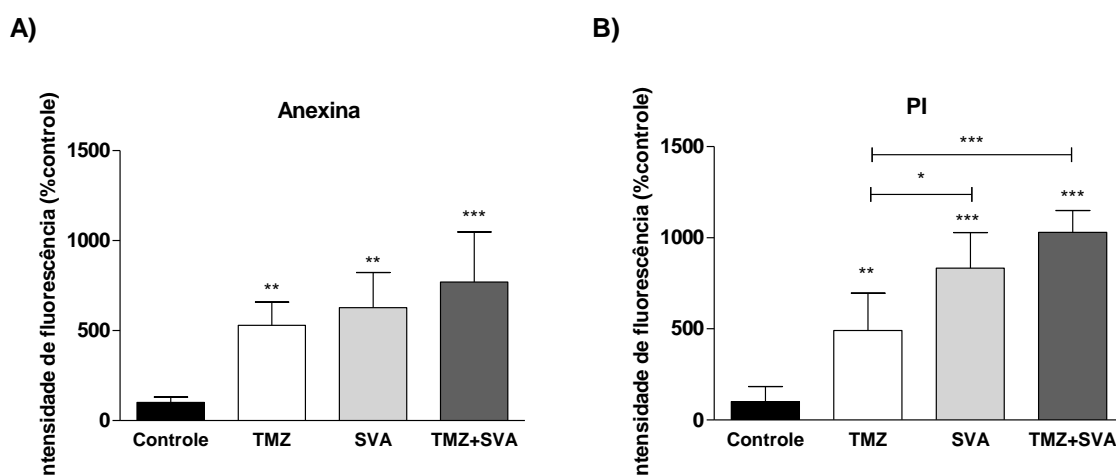


GRÁFICO 5 ANÁLISE DE MORTE CELULAR INDUZIDA PELO TRATAMENTO COM TMZ E SVA NAS ESFERAS FORMADAS EM MEIO NSC

As células U87MG foram plaqueadas em meio NSC e mantidas por 96h até a formação de esferas. Foram então tratadas por mais 72h com as condições controle (DMSO+EtOH), TMZ (100µM), SVA (1µM) e TMZ (100µM) + SVA (1µM). Após esse tempo, as esferas foram dissociadas e marcadas com Anexina e PI. Fotos de 2 experimentos independentes de todas as condições foram então tiradas no microscópio de fluorescência e as intensidades de fluorescência de cada foto quantificadas no ImageJ. Os valores de intensidade de fluorescência da anexina e do PI foram então plotados nos gráficos A e B acima, respectivamente.

6.1 AVALIAÇÃO DA MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MARCADORES DE CÉLULAS TRONCO TUMORAIS NAS ESFERAS FORMADAS EM MEIO NSC APÓS TRATAMENTO COM TMZ E SVA

Após ser visto que o tratamento conjunto de TMZ e SVA causa mudanças no fenótipo das esferas enriquecidas em células tronco, diminuindo o número e tamanho dessas, e que ainda tem a capacidade de aumentar a marcação com anexina e PI, buscou-se avaliar se essa combinação de fármacos conseguia alterar a subpopulação de células tronco tumorais nessa linhagem de glioblastoma humano, U87MG. Para isso, foi avaliada a modulação da expressão de genes marcadores de células tronco que comumente estão mais expressos em linhagens de glioma, nomeadamente, CD133, CD15 e SOX-2, no nível de mRNA por PCR em tempo real.

Observa-se no GRÁFICO 6 a expressão dos genes CD133, CD15 e SOX-2 após o tratamento de 72h com as condições controle (DMSO+EtOH), TMZ (100µM), SVA (1µM), TMZ (100µM) + (1µM) SVA. Esses resultados foram obtidos através de um experimento, porém é possível notar o mesmo perfil dentre os três marcadores de células tronco após o

tratamento. Quando as esferas são tratadas com a TMZ (coluna branca), observa-se um aumento na expressão de CD133, CD15 e Sox-2. Já quando o tratamento é realizado com a SVA isolada, nota-se uma diminuição na expressão de CD15 e Sox-2 e não há alteração na expressão de CD133. Mas, quando a SVA é inserida junto à TMZ, há diminuição da expressão dos 3 genes de interesse.

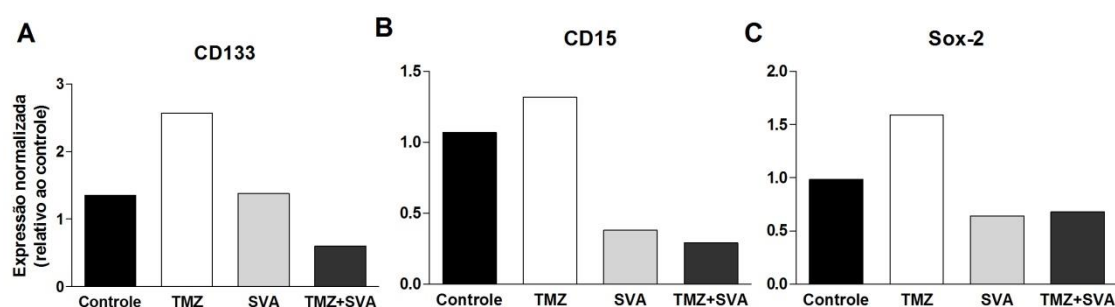


GRÁFICO 6 MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES CD133, CD15 E SOX-2 NAS ESFERAS FORMADAS EM MEIO NSC APÓS TRATAMENTO COM A COMBINAÇÃO DE TMZ E SVA

Células U87MG foram plaqueadas em meio definido e mantidas por 96h, depois disso foram tratadas por mais 72h com as condições controle (DMSO+EtOH), TMZ (100µM), SVA (1µM) e TMZ (100µM) + SVA (1µM). O RNA foi então extraído, o cDNA sintetizado e as reações de q-PCR realizadas com os primers dos genes C133, CD15 e Sox-2. O resultado é representativo de 1 experimento e os gráficos são demonstrados como expressão relativa de cada um dos genes de interesse frente à expressão dos genes de controle interno (hGAPDH, hHPRT e hHMBS).

6.2 COMPARAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO ENRIQUECIMENTO EM CSCs NAS ESFERAS FORMADAS PELO PROTOCOLO *HANGING DROP*/POLYHEMA E PELO MEIO DEFINIDO NSC

Com o objetivo de comparar o enriquecimento das esferas tanto cultivadas em *hanging drop* e substrato não aderente, polyhema, quanto nas cultivadas em meio NSC, foi realizada uma estimativa baseada nos dados de expressão de mRNA de CD133, CD15 e Sox-2. A expressão das células mantidas em meio definido (condição controle) está representada em colunas cinza claro no GRÁFICO 7. Já a expressão das esferas padronizadas em *hanging drop*/polyhema está representada em colunas cinza escuro no GRÁFICO 7. Podemos perceber que a expressão de CD133 está aumentada na condição padronizada de *hanging drop*/polyhema, quando comparada com a condição em meio definido. Esse mesmo padrão não ocorre para os marcadores CD15 e Sox-2, nos quais há maior expressão quando as células são cultivadas em meio definido (GRÁFICO 7). Apesar dos três genes serem citados como marcadores de CSCs na literatura, o CD133 é o mais

estabelecido e estudado, tornando interessante o resultado obtido, de maior enriquecimento por esse marcador.

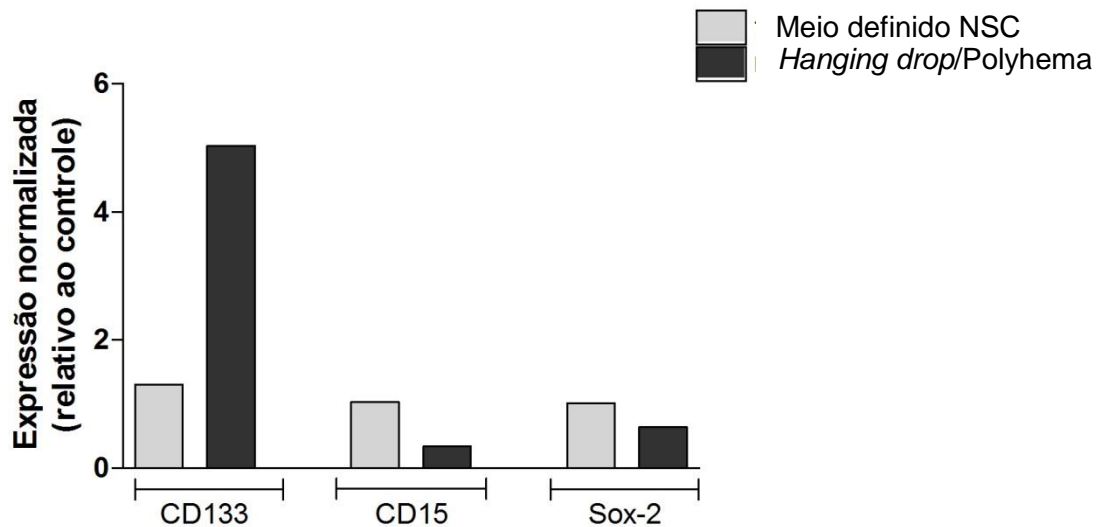


GRÁFICO 7 COMPARAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO ENRIQUECIMENTO EM CSCS NAS ESFERAS FORMADAS PELO PROTOCOLO *HANGING DROP*/POLYHEMA E PELO MEIO DEFINIDO NSC

Células U87MG foram plaqueadas (1000 células/gota) e mantidas durante 96h em meio definido seguidas de mais 72h com DMSO+EtOH; ou submetidas ao protocolo *hanging drop*/polyhema. O RNA foi então extraído dessas 2 condições, o cDNA sintetizado e as reações de q-PCR realizadas com os primers dos genes CD133, CD15 e Sox-2. O resultado é representativo de 1 experimento e o gráfico demonstrado como expressão relativa de cada um dos genes de interesse frente à expressão dos genes de controle interno (hGAPDH, hHPRT e hHMBS).

7 DISCUSSÃO

A grande maioria dos estudos toxicológicos em modelos de câncer é feita através do cultivo de células aderentes, em modelo 2D. No entanto, a forma de cultivo em modelo 3D é uma alternativa mais fidedigna para o estudo do comportamento da massa tumoral frente a um tratamento. Quando as células *in vitro* são cultivadas em esferas, apresentam um microambiente com limitação na transferência de nutrientes e oxigênio mais semelhante ao ambiente *in vivo*. Esse ambiente permite uma maior interação célula-célula e célula-matriz extracelular (MEC), além de manter um perfil de expressão gênica que mimetiza melhor o que é observado *in vivo*, quando comparado ao modelo aderente (BRESLIN; O'DRISCOLL, 2013; HIRSCHHAEUSER et al., 2010; KUNZ-SCHUGHART et al., 2004; LIN; CHANG, 2008; RAGHAVAN et al., 2016; WAGNER et al., 2011).

Com o intuito de obter resultados mais confiáveis e que reproduzam os resultados vistos no *in vivo*, o modelo de esferoides tem se mostrado muito importante como uma estratégia para o *screening* da sensibilidade de diversos tipos celulares a determinados fármacos e estudos de seus efeitos (LIN; CHANG, 2008; RAGHAVAN et al., 2016). Dentre as possíveis técnicas para obtenção desses esferoides, encontram-se: cultivo em substrato não aderente, cultivo em constante agitação, e ainda o modelo de *hanging drop* (BRESLIN; O'DRISCOLL, 2013; RAGHAVAN et al., 2016).

A técnica baseada no cultivo das células em *hanging drop* já é popular para gerar esferoides em diversas linhagens celulares, uma vez que possui vantagens em relação ao baixo custo e permite a obtenção de esferas de tamanhos similares. O trabalho de conclusão de curso (TCC) realizado pela aluna Melissa Mara da Silva (SILVA, 2016) permitiu a padronização de condições relativas ao volume das gotas plaqueadas, condição de hidratação das gotas e definição do meio de cultivo para uso da metodologia de *hanging drop* na linhagem U87MG. Uma vez definida essa padronização, foi possível neste trabalho usar essas condições para o cultivo de esferas com uma maior quantidade de células (1000 células/gota), tendo como objetivo padronizar essa técnica para o estudo de CSCs em modelo de glioblastoma.

Uma vez que o objetivo deste trabalho era de não somente criar um ambiente 3D, mas também que essa esfera formada estivesse enriquecida em células tronco tumorais, e levando em consideração que as células tronco de glioblastoma possuem características de cultivo como as das células tronco neurais normais, ou seja, tem a capacidade de formar neuroesferas, procurou-se realizar a junção de duas técnicas de cultivo 3D visando otimizar e possibilitar o enriquecimento em CSCs. Foi realizado o cultivo das células durante 3 dias em *hanging drop*, permitindo a agregação das células, e logo depois os esferoides formados

nas gotas foram realocados em um substrato não aderente (polyhema). Dessa forma, foram mantidos por mais 5 dias, período em que observou-se uma compactação das esferas, porém acompanhada de um aumento em seus diâmetros (FIGURA 4). Esse aumento, no entanto, não comprometeu as membranas celulares e não alterou a viabilidade das esferas, visto através da marcação negativa dessas com o PI (FIGURA 5). Passado esse tempo em cultivo, foi possível ver que houve um enriquecimento em CSCs, através do aumento do marcador CD133 nessas esferas, por microscopia confocal (FIGURA 7), e através do aumento da expressão de CD133, CD15 e Sox-2 por q-PCR (GRÁFICO 1 MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES CD133, CD15 E SOX-2 APÓS PADRONIZAÇÃO DO CULTIVO EM *HANGING DROP* E EM *HANGING DROP* SEGUIDO DE CULTIVO EM SUBSTRATO NÃO ADERENTE). A expressão de mRNA mostrada no presente trabalho é relativa a um experimento, por isso serão realizados mais experimentos, a fim de comprovar essa sugestão de aumento dos marcadores nas esferas quando cultivadas nas condições de *hanging drop*/polyhema.

Com esses resultados, conseguimos mostrar a efetiva padronização do método de *hanging drop*/polyhema para o enriquecimento em CSCs. Sendo que esse método possui algumas vantagens, como o baixo custo de cultivo e homogeneidade das esferas formadas. Como esse modelo ainda não foi descrito na literatura com o intuito de enriquecimento em células tronco em modelo de glioblastoma, fica difícil encontrar informações para comparações dos resultados obtidos no presente trabalho. Vale citar o trabalho de Yang e colaboradores em 2011, no qual foi utilizado o protocolo de *hanging drop* em modelo de células de câncer de cólon para analisar a expressão de CD133 após o cultivo em gotas. Nesse trabalho, foi feito primeiramente um *sorting*, no qual as células CD133⁺ eram separadas das células CD133⁻. Após isso, eles plaquearam ambas as células, positivas e negativas para CD133, em *hanging drops* e então puderam observar, através da expressão em nível de mRNA, que houve um aumento significativo da expressão de CD133 após o cultivo em *hanging drop*, isso tanto nas células já positivas, quanto nas negativas (YANG et al., 2011).

Já que o protocolo realizado se mostrou eficiente para o enriquecimento em CSCs das esferas de linhagem de glioblastoma humano, perguntou-se qual seria o efeito do tratamento com o quimioterápico padrão, TMZ, e desse quimioterápico em conjunto com a SVA nessas esferas. Sabe-se que o efeito desse quimioterápico ainda é controverso na literatura (BEIER et al., 2008; BEIER; SCHULZ; BEIER, 2011; CHUA et al., 2008; LI et al., 2015; LIU et al., 2006). No presente trabalho, o tratamento das esferas com a TMZ não promoveu diferenças morfológicas (FIGURA 8) e nem alterou o tamanho das esferas formadas em *hanging drop*/polyhema. O tratamento realizado foi durante 72h com a

concentração de 100 μ M de TMZ, e as esferas formadas a partir da padronização *hanging drop*/polyhema atingiram médias de diâmetro de cerca de 400 μ m. Vale ressaltar que os efeitos citotóxicos observados na literatura em relação à TMZ isolada são vistos quando esferas de cerca de 150 μ m são tratadas (YU et al., 2015). Podemos então estar vendo um efeito diferente no presente trabalho devido a essa diferença no tamanho das esferas. Possivelmente, devido ao maior tamanho e maior compactação das células, o quimioterápico pode não estar conseguindo difundir e ter seu efeito citotóxico. Essas células nessa forma de cultivo, podem também passar a expressar genes que as tornam mais resistentes à TMZ, fazendo com que seu efeito não seja mais visto. Como por exemplo os genes relacionados à presença e manutenção de células tronco, CD133, CD15 e Sox-2, e que já foi sugerido que estão em maior expressão (GRÁFICO 1). Além disso, a menor sensibilidade à TMZ também pode estar relacionada ao aumento da expressão de outros genes, como MGMT, por exemplo, enzima que é capaz de reparar a metilação inserida pelo quimioterápico. Alguns trabalhos já relacionam a resistência das células tronco tumorais com maiores níveis de enzimas de reparo, como a MGMT (LAI et al., 2015; QIU et al., 2014). Torna-se, então, interessante explorar essa possibilidade, estudando possíveis genes que possam estar tendo a expressão alterada durante a formação da esfera e que possam estar relacionadas com a resistência à TMZ. Ainda, vale a pena observar se o efeito da TMZ é alterado dependendo do tamanho da esfera formada.

Com relação às condições de tratamento contendo a SVA, observou-se que esse tratamento nas esferas formadas a partir da padronização *hanging drop*/polyhema não alterou o tamanho das esferas formadas, resultado similar ao observado para a condição de tratamento apenas com a TMZ. Porém, interessante, o tratamento das esferas com a SVA, tanto adicionada de forma isolada quanto com a combinação dela com a TMZ, promoveu uma alteração morfológica, formando agregados celulares com bordas irregulares, como se as células estivessem tornando-se menos coesas. Essa evidente alteração morfológica nas esferas após o tratamento com SVA e a combinação TMZ + SVA tornam interessantes futuros estudos sobre as moléculas de adesão entre as células, uma vez que alguns trabalhos já reportaram os efeitos da sinvastatina na diminuição da expressão de integrinas β 1, β 3, α 2 e α 4 β 1 e outras moléculas de adesão, como VCAM-1, no nível de mRNA e proteína, em outros modelos tumorais, de hepatocarcinoma, células do mesotélio e de câncer de ovário, e carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (RELJA et al., 2011; TAKEDA et al., 2007; WAGNER et al., 2011). Essas moléculas de adesão, dentre outras, como ICAM-1, VCAM-1, integrinas α 2 β 1, α 3 β 1 e α 5 β 1 estão presentes em glioblastoma, e a presença delas relaciona-se à tendência de infiltração desse tumor (VITOLLO et al., 1996).

O efeito de outro fármaco também da classe das estatinas, a atorvastatina, já apresentou efeitos apoptóticos tempo-concentração dependente e também diminuição na migração e invasão de células de glioblastoma cultivadas em esferas (BAYAT et al., 2016). Nesse trabalho, os autores não estudaram se havia enriquecimento em células tronco tumorais ou alteração de expressão de marcadores de CSCs após o tratamento, mas mostraram um efeito citotóxico desse fármaco nesse modelo de cultivo em 3D. Porém, o papel da SVA especificamente na subpopulação de células tronco tumorais de glioblastoma ainda não foi relatado na literatura, destacando a contribuição dos achados no presente trabalho.

Em um estudo realizado por Lee e colaboradores em 2007, foi analisado o efeito de vários compostos da classe das estatinas em células tronco embrionárias de camundongo. Eles observaram um efeito inibitório das estatinas na propriedade de auto-renovação dessas células, justificando esse efeito pela inibição da geranilgeranilação da proteína RhoA, uma proteína GTPase (LEE; CHO; HAN, 2007). Além disso, Gauthaman e colaboradores observaram um efeito inibitório de estatinas no crescimento de células tronco embrionárias humanas normais e com cariótipos anormais - duplicação dos cromossomos 12 e 17, possuindo propriedades neoplásicas. E viram que esse efeito inibitório do crescimento vinha acompanhado de uma diminuição da expressão de genes relacionados ao fenótipo de células tronco, como Oct-4 e Nanog (GAUTHAMAN; MANASI; BONGSO, 2009). Tendo em vista esse efeito da sinvastatina *in vitro* por Gauthaman e colaboradores, Renno e colaboradores exploraram o efeito *in vivo* em modelo de câncer de mama. Eles reportaram que a sinvastatina conseguiu reduzir em 80% o crescimento do tumor, e teve a capacidade de diminuir a maioria dos marcadores de CSCs. Demonstrando a capacidade desse composto em atingir não só as CSCs, mas também as células já diferenciadas (RENNO et al., 2015). Esse estudo foi o pioneiro em confirmar um efeito anti-CSCs da sinvastatina, e apesar de ser em modelo de câncer de mama, estimula a realização de estudos que investiguem o papel desse fármaco em outros modelos tumorais, como o glioblastoma.

Em paralelo ao modelo padronizado neste trabalho para o enriquecimento de CSCs através do cultivo em *hanging drop* e substrato não aderente, foi realizado o cultivo das células de glioblastoma humano, U87MG, em meio definido (aqui representado pela sigla NSC). A utilização do meio definido é a forma mais relatada na literatura para cultivo de CSCs de glioblastoma. Esse meio é enriquecido com fatores de crescimento como EGF e FGF, e permite a formação de neuroesferas e a manutenção das características de células tronco. Entretanto, esse meio de cultivo possui a limitação em relação a seu alto custo. O seu uso neste trabalho foi proposto para se obter uma comparação entre as esferas cultivadas em meio definido *versus* as esferas cultivadas em *hanging drops*. Comparação

realizada tanto em relação aos níveis de enriquecimento, quanto em relação aos efeitos da terapia combinada proposta com TMZ e SVA.

Ao compararmos o nível de enriquecimento em células tronco com a utilização de ambos protocolos, podemos afirmar que ambas metodologias foram eficazes para a finalidade de enriquecimento, visto a marcação de CD133 observada em microscopia confocal. No entanto, quando comparamos a expressão de mRNA de CD133, CD15 e Sox-2 das esferas cultivadas em *hanging drop* e mantidas em polyhema ou cultivadas em meio NSC podemos ver diferenças no enriquecimento. Na condição que as esferas foram formadas em *hanging drop*/polyhema observamos um aumento expressivo de CD133 em relação às esferas obtidas pelo uso do meio definido. Vale destacar que esse é um dos principais marcadores de CSCs utilizados na literatura. Já em relação às expressões de CD15 e Sox-2, percebe-se que as esferas formadas em meio definido apresentam um aumento de expressão desses dois marcadores em relação às esferas padronizadas em *hangingdrop*/polyhema (GRÁFICO 7). Esses resultados sugerem que as esferas obtidas por diferentes metodologias estejam expressando distintos marcadores de CSCs, que podem estar relacionados com o fenótipo de resistência ao fármaco.

Avaliando o efeito citotóxico das diferentes condições de tratamento nas esferas formadas com o meio definido NSC, percebe-se um perfil dos resultados bem diferente do relatado no modelo de esferas formadas a partir do cultivo em *hanging drop*/polyhema. No meio definido, as esferas quando tratadas com a TMZ mantiveram sua morfologia parecida ao controle (DMSO+EtOH), como observado na FIGURA 12, assim como em relação ao número e tamanho de esferas não houve alteração significativa (GRÁFICO 4). Esses dados corroboram com alguns estudos da literatura que comentam que as células enriquecidas em células tronco se mostram mais resistentes ao tratamento com TMZ (LIU et al., 2006; NIIBORI-NAMBU et al., 2013; QIU et al., 2014). Em um estudo de Niibori-Nambu e colaboradores, eles viram uma diminuição de 20% de viabilidade nas esferas tratadas com 100µM de TMZ por 72h, e morfologicamente as esferas não tinham alterações significativas (NIIBORI-NAMBU et al., 2013).

Em relação às condições de tratamento com a SVA, tanto esse composto sendo adicionado de forma isolado, como adicionado na combinação TMZ e SVA, observou-se um efeito expressivo na redução do número de esferas formadas e no tamanho dessas esferas. Sendo que a diminuição no número foi maior quando utilizada a combinação dos dois compostos. Essa diferença entre os resultados dos dois modelos pode ser devido à diferença nos tamanhos das esferas. As esferas na metodologia de *hanging drop*/polyhema apresentavam tamanhos médios de 350µm antes do tratamento (FIGURA 4), aumentando

para cerca de 400µm após o tratamento com todas as condições. Esse tamanho representa quase o dobro do tamanho das esferas após 96h de formação em meio definido NSC (FIGURA 10D), com médias que variavam de 170 a 240µm. Dessa forma, futuramente seria interessante manter as esferas em meio definido NSC por mais tempo em sua formação, a fim de obter esferas de diâmetros maiores e então tratá-las e observar seu comportamento após o tratamento.

Outra técnica realizada para avaliar os efeitos citotóxicos do tratamento combinado de TMZ e SVA nas esferas formadas em meio definido NSC foi a dupla marcação com Anexina e PI. Através da análise dos resultados da marcação em microscopia de fluorescência foi possível ver um aumento em ambos os marcadores, dando um indicativo de que as células nas esferas após o tratamento tanto com TMZ quanto com SVA e TMZ+SVA estavam externalizando fosfatidilserina, permitindo sua ligação à anexina e também estavam com maiores níveis de células com membranas celulares não íntegras. Esses resultados sugerem a indução de uma morte celular por apoptose. Esse perfil de aumento de apoptose foi visto por Bayat e colaboradores, com outra droga também da classe das estatinas, a atorvastatina, em células de glioblastoma cultivadas em esferas (BAYAT et al., 2016) e também já foi observado em CSCs de glioblastoma após o tratamento com TMZ (NIIBORI-NAMBU et al., 2013; YU et al., 2015). Vale ressaltar que no presente trabalho a quantidade de marcação tanto de anexina, quanto de PI foi mais expressiva quando o tratamento (TMZ e SVA) era administrado conjuntamente. Isso demonstra um efeito potencializador da combinação de TMZ e SVA quando comparado com o tratamento isolado de cada um dos compostos.

Ainda, foi possível analisar se a combinação de fármacos conseguia alterar a subpopulação de células tronco tumorais nessa linhagem de glioblastoma humano, U87MG. Foi então vista a modulação da expressão de genes marcadores de células tronco que comumente estão mais expressos em linhagens de glioma, nomeadamente, CD133, CD15 e SOX-2, no nível de mRNA por PCR em tempo real (GRÁFICO 6). Quando as esferas foram tratadas com a TMZ, observou-se um aumento na expressão de CD133, CD15 e Sox-2. Esse aumento já foi relatado na literatura para esses genes (GARROS-REGULEZ et al., 2016). Já quando as esferas foram tratadas com a SVA, houve diminuição apenas da expressão dos genes CD15 e SOX-2, sendo que a de CD133 se manteve igual ao controle. No entanto, interessante, quando tratadas com a combinação de TMZ+SVA, todos os três genes apresentaram sua expressão diminuída em relação ao controle. A expressão de mRNA mostrada no presente trabalho é relativa a um experimento, por isso serão realizados mais experimentos, a fim de comprovar essa sugestão de aumento/diminuição dos marcadores nas esferas após o tratamento com as condições TMZ, SVA e TMZ+SVA.

Esses dados em conjunto reforçam a importância do presente estudo, visto que este permitiu padronizar uma metodologia de baixo custo para o cultivo de CSCs de glioblastoma humano, além de estudar os efeitos citotóxicos da sinvastatina e desta em conjunto com a TMZ na subpopulação de células tronco tumorais. Sendo assim, é reforçada a importância de se conduzirem mais estudos com o intuito de elucidar por quais vias e mecanismos de ação esses fármacos podem estar exercendo seus efeitos citotóxicos em modelo de glioblastoma.

8 CONCLUSÕES

Através da análise dos dados obtidos nesse trabalho é possível concluir que:

- A padronização do cultivo em *hanging drop* e substrato não aderente (polyhema) foi conseguida de forma bastante eficiente para o enriquecimento de células tronco tumorais da linhagem U87MG de glioblastoma humano. Esse enriquecimento foi visto através do aumento da marcação de CD133 em microscopia confocal e aumento da expressão de CD133, CD15 e Sox-2 no nível de mRNA. A metodologia de cultivo em meio definido NSC também mostrou um enriquecimento em CSCs, através da marcação de CD133 por microscopia confocal.
- O tratamento de TMZ em combinação com SVA teve efeito citotóxico nas esferas formadas tanto pelo cultivo em *hanging drop* e substrato não aderente (polyhema) quanto pelo cultivo em meio definido NSC.
 - a. Sendo que em *hanging drop* e substrato não aderente:
 - não foram vistas mudanças no tamanho do esferoide formado após o tratamento.
 - houve alterações referentes à morfologia dessas células após o tratamento, quando tratadas com a SVA isolada e em combinação com a TMZ. Apresentaram morfologia menos compacta e bordas irregulares.
 - as condições de SVA e TMZ+SVA impediram a formação de esferas quando o tratamento era feito durante o cultivo em *hanging drop*.
 - b. Sendo que em meio definido NSC:
 - o tratamento foi capaz de diminuir o número e tamanho das esferas formadas; aumentou os níveis de marcação de anexina e PI (indicativo de mecanismo apoptótico), atingindo também a subpopulação de CSCs, evidenciado pela diminuição da expressão de mRNA dos marcadores CD133, CD15 e Sox-2.

REFERÊNCIAS

- ALLAHVERDIYEV, A.; BAGIROVA, M.; OZTEL, O. Aldehyde Dehydrogenase: Cancer and Stem Cells. **Dehydrogenases**, p. 3–28, 2012.
- ALTWAIRGI, A. K. **Efficacy and Safety of Atorvastatin in Combination With Radiotherapy and Temozolomide in Glioblastoma (ART)**. ClinicalTrials.gov. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02029573?term=TMZ+and+STATINS&rank=1>. Acesso em: 02/05/2015. Identifier: NCT02029573.).
- AMERICAN BRAIN TUMOR ASSOCIATION. Disponível em: <http://www.abta.org/about-us/news/brain-tumor-statistics>. Acesso em: 15/02/2017.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts & Figures. 2016.
- ANTONI, D. et al. Three-dimensional cell culture: A breakthrough in vivo. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 3, p. 5517–5527, 2015.
- BAYAT, N. et al. Apoptotic effect of atorvastatin in glioblastoma spheroids tumor cultured in fibrin gel. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie**, 2016.
- BEIER, D. et al. Temozolomide preferentially depletes cancer stem cells in glioblastoma. **Cancer Research**, v. 68, n. 14, p. 5706–5715, 2008.
- BEIER, D.; SCHULZ, J. B.; BEIER, C. P. Chemoresistance of glioblastoma cancer stem cells - much more complex than expected. **Molecular Cancer**, v. 10, n. 1, p. 128, 2011.
- BLEAU, A.-M. et al. PTEN/PI3K/Akt pathway regulates the side population phenotype and ABCG2 activity in glioma tumor stem-like cells. **October**, v. 4, n. 3, p. 226–235, 2009.
- BRADSHAW, A. et al. Cancer Stem Cell Hierarchy in Glioblastoma Multiforme. **Front Surg.**, v. 3, n. April, p. 21, 2016.
- BRESLIN, S.; O'DRISCOLL, L. Three-dimensional cell culture: The missing link in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 18, n. 5–6, p. 240–249, 2013.
- CHAN, K. K. W.; OZA, A. M.; SIU, L. L. The statins as anticancer agents. **Clinical Cancer Research**, v. 9, n. 1 I, p. 10–19, 2003.
- CHEN, K.; HUANG, Y.; CHEN, J. Understanding and targeting cancer stem cells: therapeutic implications and challenges. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 34, n. 6, p. 732–740, 2013.
- CHUA, C. et al. Characterization of a side population of astrocytoma cells in response to temozolomide. **Journal of neurosurgery**, v. 109, n. November, p. 856–866, 2008.

CLEVERS, H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. **Nature medicine**, v. 17, n. 3, p. 313–9, 2011.

COMISSÃO NACIONAL DE INCORPORAÇÃO DE TECNOLOGIAS NO SUS – CONITEC –. Temozolomida para o tratamento adjuvante de pacientes portadores de Gliomas de Alto Grau. **Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS – CONITEC** –, 2014.

CORBEIL, D. et al. The intriguing links between prominin-1 (CD133), cholesterol-based membrane microdomains, remodeling of apical plasma membrane protrusions, extracellular membrane particles, and (neuro)epithelial cell differentiation. **FEBS Letters**, v. 584, n. 9, p. 1659–1664, 2010.

DAHLROT, R. H. et al. What is the clinical value of cancer stem cell markers in gliomas? **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 6, n. 3, p. 334–348, 2013.

DAHLROT, R. H. et al. The prognostic value of clinical factors and cancer stem cell-related markers in gliomas. p. 1–27, 2014.

DEL BIGIO, M. R. Ependymal cells: Biology and pathology. **Acta Neuropathologica**, v. 119, n. 1, p. 55–73, 2010.

DEMIERRE, M.-F. et al. Statins and cancer prevention. **Nature reviews. Cancer**, v. 5, n. December, p. 930–42, 2005.

DENYSENKO, T. et al. Glioblastoma cancer stem cells: Heterogeneity, microenvironment and related therapeutic strategies. **Cell Biochemistry and Function**, v. 28, n. 5, p. 343–351, 2010.

FERRIS, J. et al. HMG CoA Reductase Inhibitors, NSAIDs and Risk of Glioma. **International Journal of Cancer**, v. 131, n. 6, p. E1031–E1037, 2012.

FUKAI, J.; KOIZUMI, F.; NAKAO, N. Enhanced anti-tumor effect of zoledronic acid combined with temozolomide against human malignant glioma cell expressing O6-methylguanine DNA methyltransferase. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. 1–13, 2014.

FULDA, S. Regulation of apoptosis pathways in cancer stem cells. **Cancer Letters**, v. 338, n. 1, p. 168–173, 2013.

GARROS-REGULEZ, L. et al. mTOR inhibition decreases SOX2-SOX9 mediated glioma stem cell activity and temozolomide resistance. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 8222, n. March, p. 393–405, 2016.

GAUTHAMAN, K.; MANASI, N.; BONGSO, A. Statins inhibit the growth of variant human

embryonic stem cells and cancer cells in vitro. **British Journal of Pharmacology**, v. 157, n. 6, p. 962–973, 2009.

GUTMANN, D. H. The taxonomy of brain cancer stem cells: what's in a name? **Oncoscience**, v. 1, n. 3, p. 241–7, 2014.

HIRSCHHAEUSER, F. et al. Multicellular tumor spheroids: An underestimated tool is catching up again. **Journal of Biotechnology**, v. 148, n. 1, p. 3–15, 2010.

IACOPINO, F. et al. Isolation of cancer stem cells from three human glioblastoma cell lines: Characterization of two selected clones. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, 2014.

INCA. **INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2016**. [s.l: s.n.].

ISCHENKO, I. et al. Cancer stem cells: how can we target them? **Current medicinal chemistry**, v. 15, n. 30, p. 3171–3184, 2008.

JHANWAR-UNIYAL, M. et al. Glioblastoma: Molecular pathways, stem cells and therapeutic targets. **Cancers**, v. 7, n. 2, p. 538–555, 2015.

JIANG, P. et al. Novel anti-glioblastoma agents and therapeutic combinations identified from a collection of FDA approved drugs. **Journal of translational medicine**, v. 12, p. 13, 2014.

JONES, R. J.; MATSUI, W. H.; SMITH, B. D. Cancer Stem Cells: Are We Missing the Target? **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 96, n. 8, p. 583–585, 2004.

JORDAN, C. T.; GUZMAN, M. L.; NOBLE, M. Cancer stem cells. **The Economist**, p. 1–2, 2008.

KAHLERT, U. D. et al. CD133/CD15 defines distinct cell subpopulations with differential in vitro clonogenic activity and stem cell-related gene expression profile in in vitro propagated glioblastoma multiforme-derived cell line with a PNET-like component. **Folia Neuropathologica**, v. 50, n. 4, p. 357–368, 2012.

KING, S. **The best selling drugs of all time; Humira joins the elite. Forbes**. Disponível em: <<http://www.forbes.com/sites/simonking/2013/01/28/the-best-selling-drugs-of-all-time-humira-joins-the-elite/>>) Acesso em: 12/05/2015.

KENSKI, J.C.N. Caracterização dos efeitos anti-proliferativos da simvastatina em células de glioma humano: Papel da interação célula-matriz e modulação da expressão de RECK e MMPs. Fevereiro, 2013. p. 01-110. Curitiba, fevereiro de 2013. Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

KIKUCHI, T.; NAGATA, Y.; ABE, T. In vitro and in vivo antiproliferative effects of simvastatin

, an HMG-CoA reductase inhibitor , on human glioma cells. p. 233–239, 1997.

KORKAYA, H.; WICHA, M. S. Selective targeting of cancer stem cells: A new concept in cancer therapeutics. **BioDrugs**, v. 21, n. 5, p. 299–310, 2007.

KRESO, A.; DICK, J. E. Evolution of the cancer stem cell model. **Cell Stem Cell**, v. 14, n. 3, p. 275–291, 2014.

KUNZ-SCHUGHART, L. et al. The Use of 3-D Cultures for High-Throughput Screening : **Journal of biomolecular screening**, v. 9, n. 4, p. 273–285, 2004.

LAI, I. C. et al. Elimination of cancer stem-like cells and potentiation of temozolomide sensitivity by honokiol in glioblastoma multiforme cells. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–18, 2015.

LEE, M.-H.; CHO, Y. S.; HAN, Y.-M. Simvastatin suppresses self-renewal of mouse embryonic stem cells by inhibiting RhoA geranylgeranylation. **Stem cells**, v. 25, n. 7, p. 1654–1663, 2007.

LENT, Roberto. **Cem Bilhões de Neurônios - conceitos fundamentais de neurociência**. 2ª edição. São Paulo. Editora Atheneu, 2010.

LI, G. et al. Effect of temozolomide on livin and caspase-3 in U251 glioma stem cells. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 9, n. 3, p. 744–750, 2015.

LI, Z. CD133: a stem cell biomarker and beyond. **Experimental hematology & oncology**, v. 2, n. 1, p. 17, 2013.

LIN, R. Z.; CHANG, H. Y. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. **Biotechnology Journal**, v. 3, n. 9–10, p. 1172–1184, 2008.

LIU, G. et al. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. **Molecular cancer**, v. 5, n. 1, p. 67, 2006.

MAO, X.-G. et al. Brain Tumor Stem–Like Cells Identified by Neural Stem Cell Marker CD15. **Translational Oncology**, v. 2, n. 4, p. 247–257, 2009.

NAKANO, I. Stem cell signature in glioblastoma: therapeutic development for a moving target. **Journal of neurosurgery**, v. 122, n. 2, p. 324–330, 2015.

NETO, A. I. et al. A novel hanging spherical drop system for the generation of cellular spheroids and high throughput combinatorial drug screening. **Biomaterials Science**, v. 3, n. 4, p. 581–585, 2015.

NIIBORI-NAMBU, A. et al. Glioma Initiating Cells Form a Differentiation Niche Via the

- Induction of Extracellular Matrices and Integrin ??V. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, 2013.
- O'CONNOR, M. L. et al. Cancer stem cells: A contentious hypothesis now moving forward. **Cancer Letters**, v. 344, n. 2, p. 180–187, 2014.
- OLIVEIRA, K. A. et al. Atorvastatin Promotes Cytotoxicity and Reduces Migration and Proliferation of Human A172 Glioma Cells. **Molecular Neurobiology**, 2017.
- OMURO, A. Glioblastoma and Other Malignant Gliomas. **Jama**, v. 310, n. 17, p. 1842, 2013.
- POINTER, K. B. et al. Glioblastoma cancer stem cells: Biomarker and therapeutic advances. **Neurochemistry International**, v. 71, n. 1, p. 1–7, 2014.
- QIU, Z. K. et al. Enhanced MGMT expression contributes to temozolomide resistance in glioma stem-like cells. **Chinese Journal of Cancer**, v. 33, n. 2, p. 115–122, 2014.
- RAGHAVAN, S. et al. Comparative analysis of tumor spheroid generation techniques for differential in vitro drug toxicity. **Oncotarget**, v. 7, n. 13, p. 16948–61, 2016.
- RASBAND, M. N. Glial contributions to neural function and disease. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, p. 1–26, 2015.
- RELJA, B. et al. Simvastatin modulates the adhesion and growth of hepatocellular carcinoma cells via decrease of integrin expression and ROCK. **International Journal of Oncology**, v. 38, n. 3, p. 879–885, 2011.
- RENNO, A. L. et al. Decreased Expression of Stem Cell Markers by Simvastatin in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)-induced Breast Cancer. **Toxicologic Pathology**, v. 43, n. 3, p. 400–410, 2015.
- SARKAR, A.; CHIOCCA, E. A. Glioblastoma and Malignant Astrocytoma. **Brain Tumors**, p. 384–407, 2012.
- SCHWARZ-CRUZY-CELIS, A.; MELÉNDEZ-ZAJGLA, J. Cancer Stem Cells. v. 63, p. 1253–1261, 2006.
- SILVA, M.M. Padronização do método *hanging drop* para cultivo de células tronco de glioma humano. Dezembro, 2016. p. 01-16. Curitiba, dezembro de 2016. Trabalho de Conclusão - Centro Universitário do Brasil, Curitiba, 2016.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE ONCOLOGIA CLÍNICA (SBOC). Manual de Condutas 2011. **Revista da Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica**, p. 589, 2011.
- SON, M. J. et al. SSEA-1 Is an Enrichment Marker for Tumor-Initiating Cells in Human Glioblastoma. **Cell Stem Cell**, v. 4, n. 5, p. 440–452, 2009.

- STUPP, R. et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 10, p. 987–996, 2005a.
- STUPP, R. et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. **The New England journal of medicine**, v. 352, n. 10, p. 987–96, 2005b.
- STUPP, R. et al. High-grade glioma: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, v. 25, n. April, p. 93–101, 2014.
- TAKEDA, I. et al. Simvastatin inactivates α 1-integrin and extracellular signal-related kinase signaling and inhibits cell proliferation in head and neck squamous cell carcinoma cells. **Cancer Science**, v. 98, n. 6, p. 890–899, 2007.
- VAN MOORST, M.; DASS, C. R. Methods for co-culturing tumour and endothelial cells: Systems and their applications. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 63, n. 12, p. 1513–1521, 2011.
- VITOLO, D. et al. Expression of adhesion molecules and extracellular matrix proteins in glioblastomas: relation to angiogenesis and spread. **Histopathology**, v. 28, n. 6, p. 521–8, 1996.
- WAGNER, B. J. et al. Simvastatin reduces tumor cell adhesion to human peritoneal mesothelial cells by decreased expression of VCAM-1 and β 1 integrin. **International journal of oncology**, v. 39, n. 6, p. 1593–600, 2011.
- WAN, F. et al. The utility and limitations of neurosphere assay, cd133 immunophenotyping and side population assay in glioma stem cell research. **Brain Pathology**, v. 20, n. 5, p. 877–889, 2010.
- WANG, H. et al. The challenges and the promise of molecular targeted therapy in malignant gliomas. **Neoplasia (New York, N.Y.)**, v. 17, n. 3, p. 239–255, 2015.
- WANG, Q.-E. DNA damage responses in cancer stem cells: Implications for cancer therapeutic strategies. **World journal of biological chemistry**, v. 6, n. 3, p. 57–64, 2015.
- WELLER, M. et al. Standards of care for treatment of recurrent glioblastoma-are we there yet? **Neuro-Oncology**, v. 15, n. 1, p. 4–27, 2013.
- WICHA, M. S.; LIU, S.; DONTU, G. Cancer stem cells: An old idea - A paradigm shift. **Cancer Research**, v. 66, n. 4, p. 1883–1890, 2006.
- WU, C.; ALMAN, B. A. Side population cells in human cancers. **Cancer Letters**, v. 268, n. 1, p. 1–9, 2008.

WU, H. et al. Effect of Simvastatin on Glioma Cell Proliferation, Migration and Apoptosis. **Neurosurgery**, v. 65, n. 6, p. 1087–1097, 2009.

YANG, Z. L. et al. Upregulated CD133 expression in tumorigenesis of colon cancer cells. **World Journal of Gastroenterology**, v. 17, n. 7, p. 932–937, 2011.

YILDIZ, Ö.C.; PÉREZ, J.H.T.; KIRCHES, E.; MAWRIN, C.; SCHNEIDER, T. **Enhancement of the temozolomide effect with atorvastatin and pioglitazone on malignant glioma.** Meeting Abstract, 66th Annual Meeting of the German Society of Neurosurgery (DGNC), Friendship Meeting with the Italian Society of Neurosurgery (SINch). Disponível em: <www.egms.de/static/en/meetings/dgnc2015/15dgnc440.shtml> Acesso em: 23/05/2015 .).

YONGJUN, Y. et al. Atorvastatin suppresses glioma invasion and migration by reducing microglial MT1-MMP expression. **Journal of Neuroimmunology**, v. 260, n. 1–2, p. 1–8, 2013.

YU, Z. et al. Metformin and temozolomide act synergistically to inhibit growth of glioma cells and glioma stem cells in vitro and in vivo. **Oncotarget**, v. 6, n. 32, p. 32930–32943, 2015.

ZHANG, J.; STEVENS, M. F. G.; BRADSHAW, T. D. **Temozolomide: Mechanisms of Action, Repair and Resistance** *Current Molecular Pharmacology*, 2012.

ZHANG, M. et al. Nestin and CD133: valuable stem cell-specific markers for determining clinical outcome of glioma patients. **Journal of experimental & clinical cancer research : CR**, v. 27, p. 85, 2008.